

**Die Bedeutung der cyclischen 2,3-Diphosphoglycerat Synthetase
für die temperaturabhängige Regulation der intrazellulären
Konzentration von cyclischem 2,3-Diphosphoglycerat im
hyperthermophilen Archaeum *Methanothermus fervidus***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs

Bio- und Geowissenschaften,
Landschaftsarchitektur

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Patrick Moritz

aus Bochum

Februar 2003

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden im Fachbereich 9 in der Abteilung Mikrobiologie an der Universität Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Hensel, Essen

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Hengstenberg, Bochum

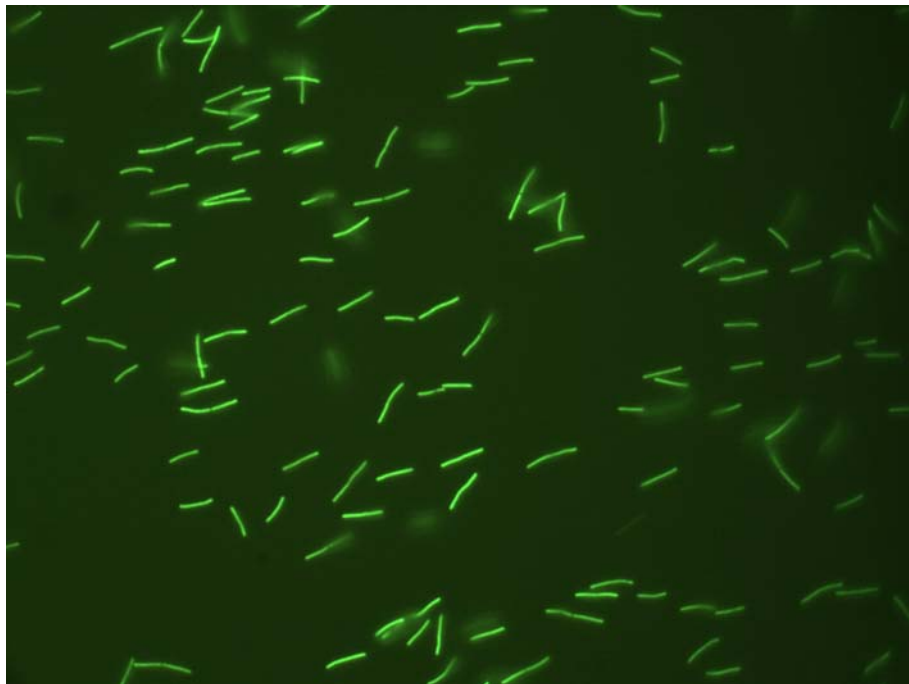
Vorsitzender des Prüfungsausschusses: PD Dr. Daniel Hering, Essen

Tag der mündlichen Prüfung: 09.04.03

Meinen Eltern für Geduld und Verständnis

An unmöglichen Dingen soll man selten verzweifeln,
an schweren nie.

Johann Wolfgang von Goethe



Autofluoreszenz bei *Methanothermus fervidus* durch das Co-Enzym F₄₂₀

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	6
2.1 Chemikalien und Enzyme	6
2.2 Geräte	7
2.3 Organismen	8
2.4 Plasmide	9
2.5 Anzucht von Mikroorganismen	9
2.5.1 Anzucht von <i>Methanothermus fervidus</i>	9
2.5.2 Temperatur-Umstellungsexperimente mit <i>Mt. fervidus</i>	11
2.5.3 Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	12
2.6 Molekularbiologische Untersuchungen mit DNS	12
2.6.1 Isolierung von genomischer DNS aus <i>Mt. fervidus</i>	12
2.6.2 Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i> zur Restriktion und Klonierung	13
2.6.3 Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i> zur Sequenzierung	13
2.6.4 Phenol/Choroform-Extraktion von DNS	13
2.6.5 DNS-Präzipitation	14
2.6.6 Quantitative und qualitative Analyse von DNS	14
2.6.7 Agarose-Gel-Elektrophorese von DNS	14
2.6.8 Reinigung von DNS-Fragmenten	15
2.6.8.1 Extraktion von DNS aus TAE-Agarose-Gelen	15
2.6.8.2 Reinigung von PCR-Produkten	15
2.6.9 <i>In vitro</i> -Rekombination von DNS	15
2.6.9.1 Restriktion	15
2.6.9.2 Dephosphorylierung von restringierten DNS-Fragmenten	15
2.6.9.3 Ligation	16
2.6.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	16
2.6.10.1 Amplifikation genomischer DNS durch PCR	17
2.6.10.2 PCR-Mutagenese	17
2.6.11 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNS	17
2.6.11.1 Herstellung kompetenter Zellen	17
2.6.11.2 Transformation	17
2.6.12 Sequenzierung von DNS	18
2.6.13 Software zur Auswertung molekularer Sequenzen	18
2.7 Präparation der rekombinanten cDPGS von <i>Mt. fervidus</i>	19
2.7.1 Klonierung und heterologe Expression des <i>cpgS</i> -Gens	19
2.7.2 Klonierung und heterologe Expression des <i>cpgS</i> -Gens in Gegenwart des <i>map</i> -Gens	20
2.7.3 Klonierung und heterologe Expression des <i>cpgS</i> -Gens in Gegenwart des <i>map</i> -Gens und des RIL-Plasmids	20
2.8 Analytische Methoden	20
2.8.1 Ionen-Chromatographie	20
2.8.1.1 Herstellung der Eluenten	21

2.8.1.2	Probenvorbereitung.....	21
2.8.1.3	Gerätekonfiguration und Elutionsbedingungen.....	21
2.8.1.4	Trennung von cDPG, DPG, ADP und ATP.....	22
2.8.1.5	Kalibrierstandard.....	22
2.8.2	cDPG-Detektion durch Dünnschicht-Chromatographie.....	23
2.8.3	Enzymatische Messung der cDPGS-Aktivität.....	23
2.8.4	Kernresonanz-Spektroskopie (NMR).....	25
2.9	Gewinnung von cDPG.....	25
2.9.1	Isolierung von cDPG aus <i>Mt. fervidus</i>	25
2.9.2	<i>In vitro</i> -cDPG-Synthese mit rekombinanter cDPGS.....	26
2.9.2.1	Ermittlung der Temperatur-Abhängigkeit des Reaktionsgleichgewichtes der cDPGS-Reaktion.....	26
2.9.2.2	Durchführung der <i>in vitro</i> -cDPG-Synthese.....	26
2.9.3	<i>In vivo</i> -cDPG-Synthese mit rekombinanter cDPGS und 2-PGK in <i>E. coli</i>	27
2.10	Chromatographische Aufreinigung der cDPGS.....	28
2.10.1	Aufreinigung der cDPGS aus <i>Mt. fervidus</i>	28
2.10.1.1	Aufschluss der Zellen.....	28
2.10.1.2	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie.....	29
2.10.1.3	Hydroxylapatit-Säulen-Chromatographie.....	29
2.10.1.4	Affinitäts-Chromatographie.....	29
2.10.2	Präparation der rekombinanten cDPGS von <i>Mt. fervidus</i>	29
2.11	Untersuchungen zur Charakterisierung der cDPGS-Isoformen aus <i>Mt. fervidus</i> -Zellen.....	30
2.12	Modulation der cDPGS-Aktivität durch Stoffwechsel-Metabolite.....	31
2.13	Bestimmung der thermalen Stabilität von Enzym-Proteinen.....	32
2.14	Produktion von Antikörpern.....	33
2.15	Proteinanalytische Methoden.....	33
2.15.1	Protein-Bestimmung.....	33
2.15.2	Konzentrierung von Protein-Lösungen.....	34
2.15.2.1	Molekularsieb-Zentrifugation.....	34
2.15.2.2	Acetonfällung.....	34
2.15.3	Bestimmung der molekularen Masse unter nativen Bedingungen.....	34
2.15.4	Bestimmung der molekularen Masse unter denaturierenden Bedingungen.....	35
2.15.5	Protein-Trennung durch diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli.....	35
2.15.6	Elektro-Protein-Transfer von Acrylamid-Gelen auf Blot-Membranen.....	36
2.15.7	Protein-Detektion in Acrylamid-Gelen.....	36
2.15.7.1	Coomassie Blue-Färbung.....	36
2.15.7.2	Silber-Färbung.....	37
2.15.8	Protein-Detektion auf Blot-Membranen durch immunologischen Nachweis.....	37
2.15.9	Elektrospray-Massenspektrometrie.....	38
2.15.10	Bestimmung der N-terminalen Aminosäure-Sequenz durch automatisierten Edman-Abbau.....	38
3.	Ergebnisse.....	39
3.1	cDPG: Vorkommen, Temperatur-Abhängigkeit der intrazellulären Konzentration, thermoprotektive Wirkung.....	39
3.1.1	Vorkommen von cDPG.....	39
3.1.2	Temperatur-Abhängigkeit der intrazellulären cDPG-Konzentration in <i>Mt. fervidus</i>	44
3.1.3	Stabilisierende Wirkung von cDPG auf Enzyme von hyperthermophilen und mesophilen Organismen.....	46
3.2	Charakterisierung der cDPG Synthetase (cDPGS) aus <i>Mt. fervidus</i> -Zellen, die bei optimaler Wachstumstemperatur gezogen wurden.....	48
3.2.1	Makromolekulare Eigenschaften.....	48
3.2.2	Kinetische Eigenschaften.....	50

3.3	Expression und Charakterisierung der rekombinanten cDPGS	51
3.3.1	Expression der <i>Mt. fervidus</i> cDPGS in <i>E. coli</i>	51
3.3.2	Makromolekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten cDPGS	53
3.4	Temperatur-Einfluss auf die phänotypische Ausprägung der cDPGS in <i>Mt. fervidus</i>	54
3.4.1	Einfluss der Temperatur auf das Isomerenverhältnis der cDPGS	54
3.4.2	Kinetische Eigenschaften der Hoch- und Niedertemperatur-Variante der cDPGS von <i>Mt. fervidus</i>	58
3.5	Analyse struktureller Unterschiede zwischen den beiden cDPGS-Isoformen	60
3.6	Versuche zur biotechnologischen Produktion von cDPG	63
3.6.1	<i>In vitro</i> -Verfahren	63
3.6.2	<i>In vivo</i> -Verfahren	65
3.7	Spektroskopische Befunde des <i>in vitro</i> synthetisierten cDPG	68
3.8	Ionenchromatographische Trennung der an der cDPG-Synthese beteiligten Verbindungen	71
3.9	Dünnschichtchromatographische Trennung der an der cDPG-Synthese beteiligten Verbindungen	72
4.	Diskussion	73
4.1	cDPG, ein thermokompatibles Solut	73
4.1.1	Wirkung von cDPG auf die Stabilität von Enzym-Proteinen	73
4.1.2	Temperatur-Abhängigkeit der cDPG-Akkumulation	74
4.2	cDPGS, der zentrale Schalter der cDPG vermittelten Thermo-Adaption in <i>Mt. fervidus</i> ?	76
4.2.1	Makromolekulare Struktur und kinetische Eigenschaften der cDPGS aus <i>Mt. fervidus</i> -Zellen, die bei optimaler Wachstumstemperatur gezogen wurden	77
4.2.2	Makromolekulare Struktur und kinetische Eigenschaften der rekombinanten cDPGS	79
4.2.3	Einfluss der Wachstumstemperatur auf die phänotypische Ausprägung der cDPGS aus <i>Mt. fervidus</i>	81
4.3	Vorarbeiten zur biotechnischen Produktion von cDPG	83
5.	Zusammenfassung	84
6.	Literaturverzeichnis	87
7.	Anhang	102
7.1	Bestimmung der cDPGS-Substratsättigung	102
7.1.1	cDPGS aus <i>Mt. fervidus</i> -Zellen, die bei const. 83° C kultiviert wurden	102
7.1.2	Rekombinante cDPGS aus <i>E. coli</i> Mfe-cDPGS-MAP-pjf	103
7.1.3	cDPGS aus <i>Mt. fervidus</i> -Zellen, mit denen in der logarithmischen Wachstumsphase eine Temperatur-Erniedrigung von 83° C auf 68° C durchgeführt wurde	104
7.1.4	cDPGS aus <i>Mt. fervidus</i> -Zellen, mit denen in der logarithmischen Wachstumsphase eine Temperatur-Erhöhung von 83° C auf 93° C durchgeführt wurde	106

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Strukturformel von cylischem 2,3-Diphosphoglycerat (cDPG)	4
Abb. 2:	Aminosäure-Sequenz-Vergleich der cDPGS von <i>Mt. fervidus</i> mit cDPGS-Homologen verschiedener euryarchaealer Vertreter	41
Abb. 3:	Aminosäure-Sequenz-Vergleich der 2-PGK von <i>Mt. fervidus</i> mit 2-PGK-Homologen verschiedener euryarchaealer und einem bacterialen Vertreter	42
Abb. 4:	Western Blot-Analyse von Roh-Extrakten aus <i>Mt. fervidus</i> , <i>Mp. kandleri</i> und <i>P. woesei</i> nach Reaktion mit Anti-Serum gegen rekombinante cDPGS von <i>Mt. fervidus</i>	43
Abb. 5:	cDPG-Konzentrationsanpassung in <i>Mt. fervidus</i> nach einer Temperatur-Veränderung von 83° C auf 93° C bzw. 68° C in der frühen logarithmischen Wachstumsphase	45
Abb. 6:	cDPG-Konzentrationsanpassung in <i>Mt. fervidus</i> nach einer Temperatur-Veränderung von 83° C auf 93° C bzw. 68° C in der stationären Wachstumsphase	45
Abb. 7:	Thermo-Stabilisierung verschiedener Enzyme aus <i>T. tenax</i> , <i>P. woesei</i> und <i>Mt. fervidus</i> durch K-Salze von cDPG oder DIP	46
Abb. 8:	Einfluss von K-Salzen des cDPG oder DIP auf verschiedene mesophile Enzyme unter Temperatur-Stress	47
Abb. 9:	Elektropherogramm einer SDS-PAGE mit Reinigungsfractionen der cDPGS aus <i>Mt. fervidus</i> und rcDPGS aus <i>E. coli</i>	49
Abb. 10:	Bestimmung des Molekulargewichtes der cDPGS aus <i>Mt. fervidus</i> unter nativen Bedingungen über HighLoad Superdex	50
Abb. 11:	Elektropherogramm von je 2 µg Roh-Extrakt rekombinanter cDPGS aus <i>E. coli</i> BL21(DE3) nach Hitzefällung	53
Abb. 12:	Western Blot-Analyse von <i>Mt. fervidus</i> -cDPGS mit Hilfe von anti-cDPGS-Serum	54
Abb. 13:	Western Blot-Analyse von cDPGS aus <i>Mt. fervidus</i> und dazugehörige intrazelluläre cDPG-Konzentration	56
Abb. 14:	Änderung des Verhältnisses zwischen beiden cDPGS-Isoformen nach Erniedrigung (83° C → 68° C) bzw. Erhöhung (83° C → 93° C) der Anzucht-Temperatur in der logarithmischen Wachstumsphase	57
Abb. 15:	Änderung des Verhältnisses zwischen beiden cDPGS-Isoformen nach Erniedrigung (83° C → 68° C) bzw. Erhöhung (83° C → 93° C) der Anzucht-Temperatur in der stationären Wachstumsphase	57
Abb. 16:	Elektropherogramm einer SDS-PAGE mit cDPGS aus <i>Mt. fervidus</i>	62
Abb. 17:	Western Blot-Analyse mit rekombinanter cDPGS	62
Abb. 18:	Kinetik einer <i>in vitro</i> -cDPG-Synthese unter Verwendung von rcDPGS bei 30° C	64
Abb. 19:	Van't-Hoff-Plot zur Temperatur-Abhängigkeit des cDPGS-Reaktionsgleichgewichtes	65
Abb. 20:	Indizierung der Protonen und der Phosphate im cDPG	68
Abb. 21:	¹ H-NMR von cDPG	68
Abb. 22:	³¹ P-entkoppeltes ¹ H-NMR von cDPG	69
Abb. 23:	³¹ P-NMR von DPG und cDPG	70
Abb. 24:	¹³ C-NMR von cDPG	70
Abb. 25:	Trennung der durch cDPGS umgesetzten Substanzen, Detektion über Leitfähigkeit	71
Abb. 26:	Trennung der durch cDPGS umgesetzten Substanzen, Detektion über UV-Absorption	72

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Archaeale Repräsentanten verschiedener Extremstandorte	1
Tab. 2:	Kalibrierstandard für Ionen-Chromatographie	22
Tab. 3:	Aminosäure-Identitäten [%] der cDPGS und 2-PGK von <i>Mt. fervidus</i> mit Enzym-Homologen diverser Prokaryonten	43
Tab. 4:	Reinigung der cDPGS aus <i>Mt. fervidus</i>	48
Tab. 5:	Kinetische Eigenschaften der cDPGS aus <i>Mt. fervidus</i> -Kulturen, die bei einer Anzucht-Temperatur von 83° C gezogen wurden	50
Tab. 6:	Reinigung der cDPGS aus <i>E. coli</i>	52
Tab. 7:	Kinetische Eigenschaften der rekombinanten cDPGS aus <i>E. coli</i>	53
Tab. 8:	Kinetische Eigenschaften der Hoch- und Niedertemperatur-Variante der cDPGS	58
Tab. 9:	cDPG-Synthese einer Hoch- bzw. Niedertemperatur-Variante der cDPGS in Gegenwart verschiedener Additive	60
Tab. 10:	Experimente zur Steigerung der <i>in vivo</i> -Produktion von cDPG im rekombinanten <i>E.coli</i> -Stamm Mfe-2-PGK-pET24a/cDPGS-pET15b	67
Tab. 11:	R _f -Werte cDPG-Synthese relevanter Verbindungen	72

Abkürzungen

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
abs.	absolut
Ac	Acetat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BAA	Bisacrylamid
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDPG	cyclisches 2,3-Diphosphoglycerat
cDPGS	cyclische 2,3-Diphosphoglycerat Synthetase
CHES	2-(N-Cyclohexylamino)ethansulfonsäure
const.	konstant
<i>cpgS</i>	cyclische 2,3-Diphosphoglycerat Synthetase codierendes Gen
CS	Citrat Synthase
DC	Dünnschicht-Chromatographie
d.h.	das heisst
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DIP	Di-myo-Inositol-1,1'-phosphat
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DPG	2,3-Diphosphoglycerat
ds	doppelsträngig
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EMP-Weg	Embden-Meyerhof-Parnas-Weg
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
etc.	et cetera (und so weiter)
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
F-1-P	Fructose-1-phosphat
F-6-P	Fructose-6-phosphat
g	Gramm
x g	Fallbeschleunigung
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GAPN	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase, nichtphosphorylierende Species
GDH	α -Glycerin-phosphat-Dehydrogenase
G-1-P	Glucose-1-phosphat
G-6-P	Glucose-6-phosphat
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
Hz	Hertz
IC	Ionen-Chromatographie
incl.	inclusive
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
i. Vak.	im Vakuum

K	absolute Temperatur in Kelvin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K_M	Michaelis-Konstante
l	Liter
λ	Wellenlänge
LB	Luria Bertani
LDH	Lactat Dehydrogenase
log.	logarithmisch
M	molar (mol l^{-1})
m	milli (10^{-3})
μ	mikro (10^{-6})
mA	Milliampere
MAP	Methionin-Aminopeptidase
<i>map</i>	Methionin-Aminopeptidase codierendes Gen
mg^{-1} Prot.	pro Milligramm Protein
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
M_r	molekulare Masse
MW	Molekulargewicht
n	nano (10^{-9})
NAD^+	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduzierte Form)
NADP^+	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduzierte Form)
NBT	Nitro Blue Tetrazolium (p-Nitrotetrazoliumblau)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernmagnetische Resonanz)
OD_{xxx}	optische Dichte bei einer Lichtwellenlänge von xxx nm
OAA	Oxalacetat
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
p.A.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
Pa	Pascal (Druckeinheit; 1 bar = 10^5 Pa)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEP	Phosphoenolpyruvat
2-PG	2-Phosphoglycerat
3-PG	3-Phosphoglycerat
PGK	Phosphoglycerat-Kinase
PGM	Phosphoglycerat-Mutase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+ -Ionenkonzentration
P_i	anorganisches Phosphat
ppm	parts per million
Prot.	Protein
psi	pounds per square inch (Druckeinheit; 1 bar = 14,5 psi)
r	rekombinant
rel.	relativ(e)
R-5-P	Ribose-5-Phosphat
RNase	Ribonuclease
RNS	Ribonucleinsäure
RT	Raum-Temperatur

s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
sog.	sogenannte
spez.	spezifische
ss	single stranded (einzelsträngig)
stat.	stationär
t _½	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloroacetic Acid (Trichloressigsäure)
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TES-Puffer	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-2-amino-ethansulfonsäure
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
Temp.	Temperatur
TIM	Triosephosphat-Isomerase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit; 1 µmol min ⁻¹)
u.a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VE	vollentsalzt
vgl.	vergleiche
<i>V</i> _{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit
Vol.	Volumen
WWW	World Wide Web
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	I	Ile	Isoleucin	R	Arg	Arginin
C	Cys	Cystein	K	Lys	Lysin	S	Ser	Serin
D	Asp	Aspartat	L	Leu	Leucin	T	Thr	Threonin
E	Glu	Glutamat	M	Met	Methionin	V	Val	Valin
F	Phe	Phenylalanin	N	Asn	Asparagin	W	Trp	Tryptophan
G	Gly	Glycin	P	Pro	Prolin	Y	Tyr	Tyrosin
H	His	Histidin	Q	Gln	Glutamin			

Nucleoside und Nucleotide

A	Adenosin	ATP	Adenosintriphosphat
C	Cytidin	CTP	Cytidintriphosphat
G	Guanosin	GTP	Guanosintriphosphat
T	Thymidin	TTP	Thymidintriphosphat
U	Uracil	UTP	Uraciltriphosphat
N	unspezifiziertes Nucleotid	NTP	Nucleosidtriphosphat
dNTP	desoxy-NTP		

1. Einleitung

Wie heute allgemein akzeptiert, weist die Entwicklung des Lebens drei Hauptlinien auf, deren Deszendenten die Domänen der Archaea, Bacteria und Eucarya bilden (Woese und Fox, 1977; Woese *et al.*, 1990). Insbesondere die Mitglieder der Archaea haben in den letzten zwei Dekaden das Interesse der Wissenschaft geweckt, da sie eine Reihe von Besonderheiten aufweisen. Bemerkenswert ist vor allem ihre Anpassungsfähigkeit an extreme Bedingungen. So wurden archaeale Species in Habitaten mit extrem hohem Druck, niedrigen oder hohen pH-Werten, unter Hochsalzbedingungen oder bei sehr hohen Temperaturen entdeckt (Rothschild und Mancinelli, 2001). Dadurch ergeben sich zwangsläufig Fragen nach den molekularen Hintergründen dieser Anpassungen. Die Aufklärung dieser Zusammenhänge ist nicht nur aus der Sicht der Grundlagenforschung interessant, sondern besitzt auch unter dem Gesichtspunkt der Anwendung große Attraktivität. Hohes wissenschaftliches Interesse kommt diesen Organismen auch in Hinblick auf die Aufklärung der Evolution des Lebens zu. Diskutiert wird, dass die extremen Standorte die Freiheitsgrade der Entwicklung einschränken und eine Konservierung ursprünglicher Merkmale bedingen (Zillig, 1991; Kandler, 1992).

Tab. 1: Archaeale Repräsentanten verschiedener Extremstandorte.

Umwelt-Parameter	Bezeichnung	Beschreibung	Beispiele
Druck			
z.B. Tiefseegräben	Barophile	Umgebungsdruck ≥ 40 MPa	<i>Pyrococcus abyssi</i> (Erauso <i>et al.</i> , 1993); <i>Thermococcus barophilus</i> (Marteinsson <i>et al.</i> , 1999)
pH			
z. B. Sodaseen	Alkalophile	pH > 9	<i>Natronomonas pharaonis</i> (Soliman und Trüper, 1982); <i>Halorubrum vacuolatum</i> Mwatha und Grant, 1993)
z. B. saure Böden	Acidophile	pH < 2	<i>Picrophilus torridus</i> (Schleper <i>et al.</i> , 1996); <i>Ferroplasma acidiphilum</i> , (Golyshina <i>et al.</i> , 2000)
Salinität			
z.B. Salzseen	Halophile	Salz- Konzentration 2-5 M	<i>Natronococcus occultus</i> (Tindall <i>et al.</i> , 1984); <i>Natrialba asiatica</i> (Kamekura und Dyall-Smith., 1995),
Temperatur			
z.B. heiße Quellen, "Black Smoker"	Hyper- thermophile	Umgebungs- temperatur > 80° C	<i>Methanothermus fervidus</i> (Stetter <i>et al.</i> , 1981); <i>Pyrococcus woesei</i> (Zillig <i>et al.</i> , 1987); <i>Pyrolobus fumarii</i> (Blöchl <i>et al.</i> , 1997)
Metall			
z.B. Erzminen		metallotolerant	<i>Ferroplasma acidarmanus</i> (unveröffentlicht, s. auch www.ncbi.nlm.nih.gov), <i>Metallosphaera prunea</i> (Fuchs <i>et al.</i> , 1995)

Bei Vergleichen mit Bacteria und Eucarya konnten viele Gemeinsamkeiten, aber auch klare Unterschiede der Archaea zu den beiden anderen Domänen nachgewiesen werden. Wie bei den morphologisch ähnlichen Bacteria sind die Gene der Archaea in Operons organisiert, es fehlen die Nuclei und der metabolische Stoffwechsel wird häufig mittels des (meist mehr oder weniger modifizierten) Entner-Doudoroff-Weges durchgeführt. Im Gegensatz dazu wurde Murein als Bestandteil der bacterialen Zellwand bei Archaea bislang nicht nachgewiesen. Spezifische Ähnlichkeiten zu den Eucarya zeigen sich im Transkriptionsapparat, Vorkommen von Histonen (zumindest bei den Euryarchaea) und in der Existenz von Intronstrukturen in der tRNA. Unterschiede zu Eucarya und Bacteria findet man z.B. in der Cytoplasma-Membran, die Phytanylether-Lipide (Di- oder Tetraetherlipide) statt Fettsäureglycerinester aufweist, eine Besonderheit, die als Anpassung an extreme Standorte diskutiert wird (de Rosa und Gambacorta, 1988).

Verbesserungen von Isolierungs-, Kultur- und Analyse-Techniken ließen hyperthermophile Organismen in den letzten Jahren in den Mittelpunkt zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen rücken. Aus der Domäne der Eucarya findet man bislang nur wenige Vertreter mit höheren Wachstumstemperaturen; das Maximum für diese Organismen, darunter einige Protozoen, Algen oder Pilze, liegt bei 60° C (Rothschild und Mancinelli, 2001). Dagegen weisen die nur von archaealen und einigen bacterialen Species repräsentierten hyperthermophilen Organismen optimale Wachstumstemperaturen zwischen 80 und 110° C auf. Diese ließen sich an unterschiedlichsten terrestrischen und marinen Standorten isolieren, und zwar sowohl in natürlichen als auch in vom Menschen geschaffenen künstlichen Habitaten. Momentan führt *Pyrolobus fumarii* die Liste bekannter hyperthermophiler Organismen mit einer maximalen Wachstumstemperatur von 113° C an; bei 90° C fällt dieses nitratreduzierende und chemolithotrophe Crenarchaeum in "Kältestarre" (Blöchl *et al.*, 1997).

Anpassungen an hohe Temperaturen erfordern spezifische Voraussetzungen auf der Ebene von niedermolekularen (Metabolite, Intermediate) und hochmolekularen Komponenten (Proteine, Membranen, Nucleinsäuren), um einen positiven Stoffwechsel zu ermöglichen. So muss gewährleistet sein, dass - auch thermolabile - Intermediate und Metabolite wie ATP ($t_{1/2}$ bei 90° C = 115 min) (Kengen *et al.*, 1996) und 1,3-Diphosphoglycerat ($t_{1/2}$ bei 60° C = 1,6 min) (Prof. R. Hensel, persönliche Mitteilung) oder DHAP ($t_{1/2}$ bei 80° C = 17,3 min) und GAP ($t_{1/2}$ bei 80° C = 3,4 min) (Schramm *et al.*, 2001) zur Verfügung stehen.

Denkbar wäre ein Schutz vor entsprechender Hitzedestruktion durch Bindung an Proteine oder generell durch eine Reduktion des entsprechenden intrazellulären Pools. Eine erhöhte Re-Synthese dieser labilen Komponenten als Anpassung an hohe Wachstumstemperaturen erscheint aufgrund des damit verbundenen hohen energetischen Aufwandes eher unwahrscheinlich.

Zahlreiche Untersuchungen liegen inzwischen vor, die strukturellen Hintergründe für die geforderte hohe Thermo-Stabilität von Makromolekülen, wie von Enzym-Proteinen zu verstehen. Als wichtige strukturelle Faktoren, die die Thermo-Stabilität von Proteinen erhöhen, gelten die Verstärkung der hydrophoben Wechselwirkungen, Reduktion von Kavitäten, Ionenpaare bzw. Ionenpaarnetzwerke insbesondere an Protein-Oberflächen, Dipol-Dipol-

Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Oligomerisierungen von Proteinen oder der Austausch von sensitiven (z.B. Asparagin, Glutamin, Cystein) zugunsten von thermoresistenten Aminosäuren an exponierten Stellen (Vieille und Zeikus, 2001). Allerdings lassen sich keine generellen Regeln erkennen, die bei der Thermo-Adaption verfolgt werden. Vielmehr findet man oftmals eine Kombination der Strategien, mit denen die notwendige Stabilität erzielt wird.

Neben diesen strukturellen, intrinsischen Faktoren sind extrinsische Faktoren zur Aufrechterhaltung der physiologischen Aktivität der Enzym-Proteine von hoher Bedeutung. Die ersten Hinweise für die Mitwirkung niedermolekularer Komponenten an der Stabilisierung von Proteinen fand man bei halophilen Organismen, die unter osmotischem Stress (osmo-)kompatible Solute (z.B. Ectoin, Prolin oder Betain) selektiv aufnehmen oder synthetisieren (Galinski *et al.*, 1985; Csonka, 1981; Shkedy-Vinkler und Avi-Dor, 1975). Prinzipiell wird hier dem hypersalinen Medium dadurch begegnet, dass das intrazelluläre Milieu diesen osmotischen Bedingungen durch Akkumulation von kompatiblen Soluten angepasst wird, ohne zu einer Beeinträchtigung des Stoffwechsels zu führen (Brown, 1976). Auch bei hyperthermophilen Vertretern konnten auffallend hohe Konzentrationen von Soluten, wie z.B. cyclisches 2,3-Diphosphoglycerat (cDPG) (Kanodia und Roberts, 1983; Seely und Fahrney, 1983; Hensel und König, 1988; Matussek *et al.*, 1998; Shima *et al.*, 1998), Di-*myo*-inositol-1,1'-phosphat (DIP) (Scholz *et al.*, 1992; Ciulla *et al.*, 1994; Martins und Santos, 1995; Martins *et al.*, 1996; Ramakrishnan *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 1997; Lamosa *et al.*, 1998), 2-*O*- β -Mannosylglycerat (Martins und Santos, 1995; Martins *et al.*, 1997), 2-*O*- β -di-mannosyl-di-*myo*-inositol-1,1'-phosphat (Martins *et al.*, 1996), Di-glycerol-phosphat (Martins *et al.*, 1997) oder Trehalose (Martins *et al.*, 1997) gefunden werden. Für die meisten dieser Verbindungen konnten deutlich thermostabilisierende Effekte auf Enzym-Proteine festgestellt werden. Insofern scheint die Bezeichnung dieser Komponenten als thermokompatible Solute gerechtfertigt.

Seit einigen Jahren werden in der Arbeitsgruppe von Prof. Hensel nähere Untersuchungen zur Biosynthese, intrazellulären Konzentration und Wirkung von cDPG und DIP in thermophilen Archaea durchgeführt. Bereits bekannt ist, dass die Konzentration beider Komponenten bei höheren Wachstumstemperaturen in den entsprechenden Organismen ansteigt (Hensel und König, 1988; Martins und Santos, 1995; Wolff, 2001). Darüber hinaus konnte bei mehreren Enzym-Proteinen aus hyperthermophilen Vertretern der *Methanobacteriales*, *Thermococcales* und *Thermoproteales* in Gegenwart der Komponenten eine Erhöhung der thermalen Stabilität *in vitro* erzielt werden (Hensel *et al.*, 1998).

cDPG wurde zunächst im methanogenen Archaeum *Methanothermobacter thermautotrophicus* (Basionym: *Methanobacterium thermoautotrophicum*; Wasserfallen *et al.*, 2000) gefunden (Kanodia und Roberts, 1983; Seely und Fahrney, 1983). Der Ladungsausgleich von diesem dreiwertigen Anion und der in *Mb. thermautotrophicus* außerdem detektierten relativ hohen Konzentrationen von Glutaminsäure und 1,3,4,6-Hexancarboxylsäure (Gorkovenko *et al.*, 1994) findet vermutlich durch Kalium-Kationen statt, die in hoher Konzentration (710 mM) gefunden wurden (Hensel und König, 1988).

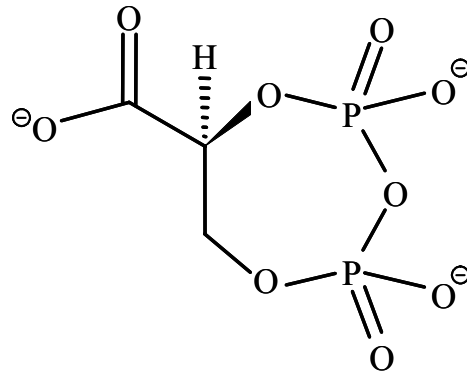
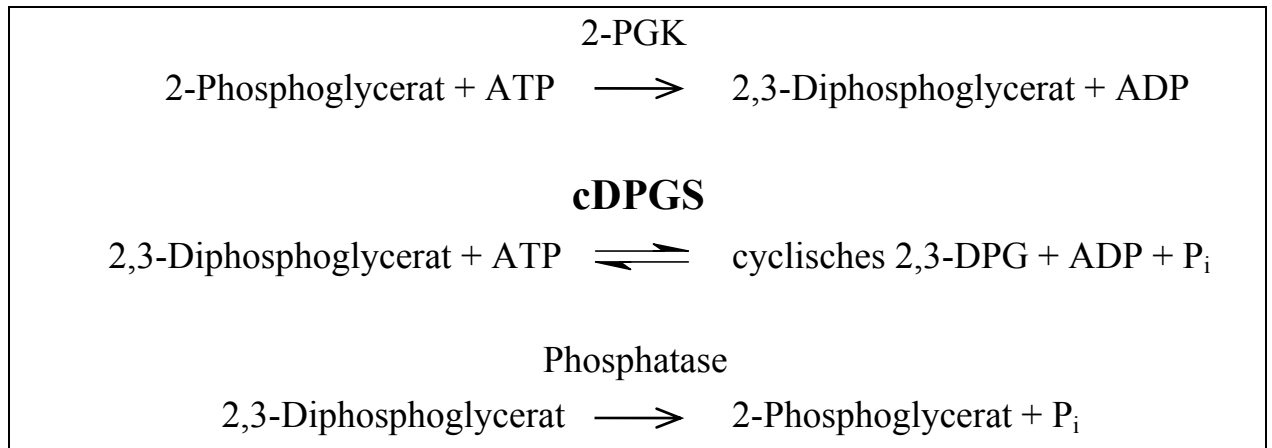


Abb. 1: Strukturformel von cyclischem 2,3-Diphosphoglycerat (cDPG).

Während das Vorkommen von DIP nicht nur auf Archaea beschränkt ist, sondern auch bei Bacteria beschrieben wurde (Martins *et al.*, 1996; Ramakrishnan *et al.*, 1997), konnte cDPG bislang nur in Vertretern der *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales* und *Methanopyrales*, also ausschliesslich methanogenen Mitgliedern der Archaea, nachgewiesen werden. Ein Vergleich von verschiedenen cDPG-positiven Species zeigt, dass die intrazelluläre Konzentration der niedermolekularen Substanz mit Zunahme der jeweiligen optimalen Wachstumstemperatur ansteigt: So wurde im mesophilen *Methanobacterium bryantii* (optimale Wachstumstemperatur: 37° C) eine Konzentration von 90 mM gefunden, während in den hyperthermophilen Vertretern *Methanothermus fervidus* (optimale Wachstumstemperatur: 83° C), *Methanothermus sociabilis* (optimale Wachstumstemperatur: 88° C) und *Methanopyrus kandleri* (optimale Wachstumstemperatur: 100° C) intrazelluläre Konzentrationen von jeweils 300, 320 und 600 mM cDPG nachgewiesen werden konnten. Dadurch lag die Vermutung nahe, dass dieser niedermolekularen Substanz eher eine thermoadaptive Funktion zukommt (Hensel und König, 1988; Lehmacher und Hensel, 1990b; Matussek *et al.*, 1998) als - wie von anderen Autoren vermutet - die eines allosterischen Effektors (Kanodia und Roberts, 1983), Phosphatspeichers (Kanodia und Roberts, 1983), Chelators (Seely und Fahrney, 1983) oder Energiespeichers (Evans *et al.*, 1985).

Für *Mt. fervidus* konnten die Reaktionssequenzen für Biosynthese und Abbau des cDPG aufgeklärt werden (Lehmacher *et al.*, 1990a): Ausgehend von 2-Phosphoglycerat (2-PG) wird durch zwei ATP-verbrauchende Schritte zunächst das Zwischenprodukt 2,3-Diphosphoglycerat (DPG) synthetisiert und dann unter Bildung einer intramolekularen Phosphoanhydridbindung das Endprodukt cDPG generiert. Die erste Reaktion wird von der 2-Phosphoglyceratkinase (2-PGK) katalysiert und verläuft unidirektionell, die zweite Reaktion wird von der cyclischen 2,3-Diphosphoglycerat Synthetase (cDPGS) katalysiert und ist reversibel. Die Rückreaktion zu 2-PGK verläuft über cDPGS und eine 2,3-DPG-Phosphatase:



Matussek (1996) konnte in seiner Dissertation die cDPGS aus *Mt. fervidus* isolieren und makromolekular charakterisieren. Bei den Untersuchungen wurde für dieses Enzym nur ein Gen identifiziert, welches in *E. coli* exprimiert werden konnte. Auffallendes Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass die cDPGS aus *Mt. fervidus* stets zwei Banden im entsprechenden SDS-Gel-Elektropherogramm zeigte (apparentes Untereinheiten-Molekulargewicht 57 000 und 59 000), während das rekombinante Enzym nur eine Bande aufwies (apparentes MW 57 000).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Hintergründe für das Auftreten der zwei cDPGS-Isoformen aufzuklären. Southern Blot-Analysen, die nur ein Signal mit einer *cpgS*-spezifischen Sonde ergaben, und Analysen der N-terminalen Sequenzen, die auf die gleiche Primärstruktur beider Isoformen schließen ließen, sprechen dafür, dass die unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit dieser Species auf konformelle Unterschiede oder chemische Modifikationen zurückzuführen ist.

Da der Verdacht bestand, dass das Auftreten zweier Isoformen der cDPGS in Zusammenhang mit einer temperaturbedingten Veränderung des cDPG-Pools in der Zelle steht, sollte der Einfluss der Temperatur auf das makromolekulare Erscheinungsbild der cDPGS und ihrer enzymatischen Eigenschaften untersucht werden.

Weiter sollte dem biotechnologischen Interesse an cDPG als Protein-Stabilisator durch die Entwicklung technisch anwendbarer Produktionsverfahren Rechnung getragen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva GmbH, Heidelberg
ADP	Gerbu Handelsges., Gaiberg
AMP	Serva GmbH, Heidelberg
ATP	Gerbu Handelsges., Gaiberg
Agar und Agarose	Life Technologies, Eggenstein
APS	Sigma-Aldrich, München
Bradford-Reagenz zur Protein-Bestimmung	Biorad, München
Cellulose-Dünnschicht-Chromatographieplatte	Merck, Darmstadt
Coomassie-Brilliant-Blue R und G	Serva GmbH, Heidelberg
Cytochrom c	Sigma-Aldrich, München
2,3-Diphosphoglycerat	Sigma-Aldrich, München
DNS-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
Ferritin aus Pferdemuskel	Sigma-Aldrich, München
Fructose-1-phosphat	Sigma-Aldrich, München
Fructose-6-phosphat	Sigma-Aldrich, München
Glucose-1-phosphat	Sigma-Aldrich, München
Glucose-6-phosphat	Sigma-Aldrich, München
Hefe-Extrakt	Difco Lab., Augsburg
Hydroxylapatit fast flow	Fluka, Buchs, Schweiz
IPTG	Gerbu Handelsges., Gaiberg
Molekularmassenstandard SDS 7	Sigma-Aldrich, München
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva GmbH, Heidelberg
Natriumhydroxid (50% (w/v))	Baker, Deventer, Holland
Oligonucleotide für PCR und Sequenzierung	ARK Scientific, Heidelberg
Pyridin-Dinucleotide (NAD ⁺ , NADH ₂ , NADP ⁺ , NADPH ₂)	Gerbu Handelsges., Gaiberg
Pepton	Difco Lab., Augsburg
Phenylsepharose fast flow	Amersham Pharmacia, Freiburg
Q-Sepharose fast flow	Amersham Pharmacia, Freiburg
Rinderserum-Albumin	Sigma-Aldrich, München
Reactive Green 19 Agarose	Sigma-Aldrich, München
Restriktionsendonucleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot New England Biolabs, Frankfurt
Röntgenfilme (Agfa X-ray 90)	Linnhard, München
Sephadex G 10	Amersham Pharmacia, Freiburg

Superdex 16/200 prepgrade
Substrate für Enzymreaktionen
Trypton

Amersham Pharmacia, Freiburg
Sigma-Aldrich, München
Difco Lab., Augsburg

Sämtliche nicht aufgelisteten Festsubstanzen wurden von der Fluka GmbH (Buchs, Schweiz) oder der Gerbu Handelsgesellschaft (Gaiberg) bezogen; organische Lösungsmittel stammten von J.T. Baker B.V., Holland, C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe oder AppliChem GmbH, Darmstadt. Die Chemikalien wiesen, soweit nicht anders aufgeführt, p.A.-Qualität auf.

2.2 Geräte

Anaeroben-Kammer:

Coy Lab. Products, Ann Arbor, USA; Vertrieb
Töpfer GmbH, Göppingen

Archaea-Fermenter:

Biostat 100 l-Fermenteranlage mit emailliertem
Rührkessel; restliche Bestandteile aus Titan,
Begasungskontrolle mit Flowmetern (Braun AG,
Melsungen)

Chromatographie-Anlagen:

IC DX-500 bestehend aus Eluenten-Kabinett EO1,
Gradientenpumpe GP40, Elektro-Chemischer Detektor
ED40, Leitfähigkeitsmesszelle, UV/VIS Detektor
VDM2, Anionen-Suppressor ASRS Ultra,
Quantifizierung durch PeakNet[®] 6.2 (alles Dionex
GmbH, Idstein); Autosampler GINA 50 T (Gynko-
tek, Germering)

HPLC: Detektor 432, Gradientenformer 425, Pumpe
420, Data System 450 (Kontron Instruments, Neu-
fahm), Kollektor Frac-100 (Pharmacia, LKB, Frei-
burg)

Standardsäulen-Chromatographie: Schlauchpumpe
Minipuls 3 (Abimed, Langenfeld), UV-Detektor
Uvicord SD und Einkanalschreiber Rec 101 (Phar-
macia LKB, Freiburg)

Chromatographie-Säulen:

Leersäulen: C16/20, C26/40, C26/100 (Pharmacia
LKB, Freiburg)

Fertigsäulen: HiLoad 26/60 Superdex 200, Superose
6 (beides Pharmacia, LKB, Freiburg); IonPac AS11
Analytical und IonPac AG11 Guard Column (250 x
4 bzw. 50 x 4 mm) sowie ATC-1 Trap Column (24 x
9 mm) (alles Dionex GmbH, Idstein)

Dampf-Sterilisator:	Webeco Modell H (Webeco GmbH, Bad Schwartau)
Elektrophorese-Transferkammer:	Carbo Glas Semidry Transfersystem, Schleicher & Schuell
Gel-Elektrophorese-Kammern:	
für Agarose-Gel-Elektrophorese:	Agagel Mini (Biometra, Göttingen)
für Polyacrylamid-Gele:	Minigel-Twin (Biometra, Göttingen)
Hochdruckpresse:	French Press (SML Aminco Instruments Inc., Vertrieb der Fa. Sopra, Büttelborn)
Inkubatoren:	RFI-125 Inkubator (Infors AG, Bottmingen, Basel, Schweiz); Certomat H/Certomat R (Braun AG, Melsungen)
Membran-Filtration:	Pellikon (Millipore, Eschborn)
Mikroskope:	Olympus BH-2 RFCA und Olympus CHT (Olympus, Hamburg)
Reinstwasser-Anlage:	Seral Pro 90 CN (Elga-Seral, Ransbach-Baumbach)
Spektro-Photometer:	Philips 8720, thermostatisierbares UV/VIS Photospektrometer (Philips Analytical, Cambridge, England),
Thermocycler:	Eigenbau der Werkstätten des Max-Planck-Instituts für Biochemie, Martinsried, RoboCyler Gradient 40 (Stratagene, Amsterdam)
Vakuum-Zentrifuge:	Speedvac Concentrator (Savant, Farmingdale, USA)
Zentrifugen:	Ultrazentrifuge Centrikon T 1170 (Kontron Instruments, Neufahrn)
	Kühlzentrifuge Avanti J-25 (Beckmann, München)
	Tischzentrifuge Sigma 3K12 (Braun AG, Melsungen)

2.3 Organismen

Methanothermobacter fervidus (V24 S, DSM No. 2088, Stetter *et al.*, 1981)

Pyrococcus woesei (Vul4, DSM No. 3773, Zillig *et al.*, 1987)

Thermoproteus tenax (Kra1, DSM No. 2078, Zillig *et al.*, 1981)

Methanopyrus kandleri (AV19, DSM No. 6324, Kurr *et al.*, 1991)

Methanoterris igneus (Basonym: *Methanococcus igneus*)

(Kol5, DSM No. 5666, Burggraf *et al.*, 1990; Whitman, 2001a)

Escherichia coli XL1 Blue (Bullock *et al.*, 1987)

Escherichia coli BL21(DE3) (Studier und Moffat, 1986)

Escherichia coli BL21-CodonPlus®(DE3)-RIL (Stratagene, La Jolla, USA)

Mt. fervidus wurde zur Reinigung von cDPG und der cDPG Synthetase sowie der Gewinnung genomischer DNS kultiviert. *Mp. kandleri*- (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. K.O. Stetter, Universität Regensburg) und *Mo. igneus*-Zellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Prof. M.F. Roberts, Merkert Chemistry Center, Boston College) sowie *P. woesei*- und *T. tenax*-Zellen (AG Mikrobiologie, Prof. Hensel, Universität Duisburg-Essen) wurden für Western Blot-Analysen und ionenchromatographische Analysen verwendet. *E. coli* XL1 Blue wurde als Wirtsstamm zur Zwischenklonierung des *cpgS*-Gens eingesetzt. *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* BL21-CodonPlus®(DE3)-RIL dienten als Wirtsstämme für die heterologe Expression des im Vektor pJF118EH klonierten *cpgS*-Gens. *E. coli* BL21(DE3) diente darüber hinaus als Wirtsstamm für die heterologe Co-Expression des im Vektor pET24a klonierten *2pgk*- und im Vektor pET15b klonierten *cpgS*-Gens.

2.4 Plasmide

pET24a, Novagen, Bioggio-Lugano, Schweiz

pET15b, Novagen, Bioggio-Lugano, Schweiz

pJF118EH (Fürste *et al.*, 1986)

2.5 Anzucht von Mikroorganismen

2.5.1 Anzucht von *Methanothermus fervidus*

Das Medium für die Anzucht von *Methanothermus fervidus* setzte sich wie folgt zusammen:

Mineralien-Lösung 1	37,5	ml
Mineralien-Lösung 2	37,5	ml
NiCl ₂ *6H ₂ O	1,0	mg
FeSO ₄ *7H ₂ O	2,0	mg
Hefe-Extrakt	2,0	mg
Trypton oder Pepton	2,0	g
Vitamin-Lösung	10,0	ml
Spurenelement-Lösung	10,0	ml
Na ₂ SO ₄	3,4	g
NaHCO ₃	2,0	g
Resazurin	1,0	mg
Na ₂ S*9H ₂ O	0,5	g
Cystein*HCl	0,5	g
H ₂ O	920,0	ml

Mineralien-Lösung 1:

K_2HPO_4	6,0	g
H_2O	1000	ml

Mineralien-Lösung 2:

KH_2PO_4	6,0	g
$(NH_4)_2SO_4$	6,0	g
$NaCl$	12,0	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,4	g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,6	g
H_2O	ad 1000,0	ml

Vitamin-Lösung:

Biotin	2,0	mg
Folsäure	2,0	mg
Pyridoxin*HCl	10,0	mg
Thiamin*HCl	5,0	mg
Riboflavin	5,0	mg
Nicotinsäure	5,0	mg
DL-Calcium Pantothenat	5,0	mg
Vitamin B12	0,1	mg
p-Aminobenzoessäure	5,0	mg
Liponsäure	5,0	mg
H_2O	ad 1000,0	ml

Spurenelement-Lösung:

Nitrilotriessigsäure	1,5	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3,0	g
$NaCl$	0,5	g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1,0	g
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	0,18	g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,1	g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,18	g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,01	g
$KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	0,02	g
H_3BO_3	0,01	g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,01	g
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	g
$Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$	0,3	g
H_2O	ad 1000,0	ml

Bei der Herstellung der Spurenelement-Lösung wurde zunächst die Nitrilotriessigsäure gelöst und mit KOH ein pH-Wert von 6,5 eingestellt; anschließend erfolgte die Zugabe der Mineralien und die Erhöhung des pH-Wertes auf 7,0.

Im Medium wurde ein pH-Wert von 6,5 bei 83° C eingestellt, anschließend $NaHCO_3$ zugegeben und der Ansatz unter N_2 -Begasung für 15 min abgekühlt. Danach wurde das Medium mit $Na_2S \cdot H_2O$ reduziert und im Anaeroben-Zelt in 100 ml-Serumflaschen aus alkalireichem Glas zu

je 20 ml portioniert. Die Flaschen wurden mit Butyl-Gummistopfen verschlossen und nach mehrmaligem Gasaustausch mit H₂/CO₂ (80 % / 20 %) auf 2 bar Überdruck aufgepresst. Nach dem Autoklavieren wurde dem Medium über eine Kanüle sterile Vitamin-Lösung zugefügt. Anschließend wurden die Ansätze angeimpft (5 %) und bei 83° C ohne Schütteln 1-5 Tage inkubiert.

Die Massenproduktion von *Mt. fervidus* erfolgte in einem emaillierten 100 l-Fermenter (Archaeafermenter, Braun). Die erforderlichen Mengen Mineralien- und Spurenelement-Lösungen etc. wurden zunächst in 2 l VE-Wasser vorverdünnt und im Fermenter mit 95 l Wasser gemischt. Zum Durchmischen des Mediums wurde der Rührer mit 200 Upm betrieben. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium mit 80 % H₂ und 20 % CO₂ (Gasvolumenstrom: 1 l min⁻¹) begast, eine Temperatur von 83° C eingestellt und mit NaOH ein pH von 6,5 justiert. Anschließend wurde die noch fehlende Vitamin-Lösung sterilfiltriert injiziert und 50 g Cystein*HCl zur Reduktion des Mediums zugefügt. Nach ca. 2 h wurde der Fermenter mit einem Inokulum von 1 % (v/v) angeimpft. Das unter diesen Bedingungen ermittelte Redox-Potential lag zwischen -200 und -400 mV (Matussek, 1996), und die Wachstumsrate ist hauptsächlich durch die Löslichkeit des H₂ limitiert (Nishimura *et al.*, 1992). Daher erfolgte der Betrieb des Fermenters bei einem Überdruck von 1 bar.

Die Kontrolle des Wachstums bzw. die Ermittlung der Zelltitel erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. In der logarithmischen Wachstumsphase wurden Generationszeiten von ca. 6-8 h ermittelt. Nach ca. 100 h erreichte die Kultur im Fermenter einen maximalen Zelltitel von 4,5 x 10⁸ ml⁻¹; sie wurde vor der Zellernte mit Hilfe eines Wärmeaustauschers auf ca. 10° C abgekühlt. Größere Partikel ließen sich durch einen Faltenfilter entfernen. Danach wurden die Zellen durch Membran-Filtration (Pellikon, Millipore) auf ein Volumen von etwa 6 l eingengt und 10 min bei 8000 x g, 4° C zentrifugiert. Die Ausbeute einer 100 l-Kultur lag in Abhängigkeit der Erntephase bei ungefähr 60 g Zellen (Nassgewicht). Die so gewonnenen Zellen wurden bei -80° C gelagert.

2.5.2 Temperatur-Umstellungsexperimente mit *Mt. fervidus*

Zur Untersuchung der Temperatur-Anpassung des cDPG-Gehaltes von *Mt. fervidus*-Zellen wurden Temperatur-Umstellungsexperimente durchgeführt. Hierzu wurde der 100-l-Archaea-Fermenter mit 1 l Vorkultur angeimpft und die Kultur bei 83° C angezogen (s. Punkt 2.5.1). In der logarithmischen und stationären Phase wurde die Temperatur jeweils auf 68° C abgesenkt oder auf 93° C angehoben. Bei diesen Experimenten lagen die Zelldichten in der logarithmischen Phase bei 9,4 x 10⁷ (Erniedrigung von 83 auf 68° C) bzw. 8,7 x 10⁷ (Erhöhung von 83 auf 93° C) Zellen ml⁻¹, in der stationären Phase bei 3,5 x 10⁸ (Erniedrigung von 83 auf 68° C) und 3,2 x 10⁸ (Erhöhung von 83 auf 93° C) Zellen ml⁻¹. Die Ausbeuten betrugen ca. 0,5 g l⁻¹ Nassgewicht. Die Entnahme der Proben (5 l) erfolgte vor der Temperatur-Umstellung sowie anschließend nach

einem Zeitraum von 3, 6, 9 und 24 h. Zu Vergleichszwecken wurde jeweils eine Fermentation bei const. 83° C durchgeführt und, nach Erreichen der entsprechenden Zelldichten, Kulturproben in den gleichen Zeitabständen gewonnen. Nach der Zentrifugation der Kulturflüssigkeit (10 min, 8000 x g, 4° C) wurden die Zellen bei -80° C gelagert.

2.5.3 Anzucht von *Escherichia coli*

Rekombinante *E. coli*-Stämme wurden in Luria-Bertani-Medium (LB, 5 g l⁻¹ Hefe-Extrakt, 10 g l⁻¹ Pepton und 10 g l⁻¹ NaCl, (pH = 7), Volumen 3-50 ml) bei 37° C und 225 Upm Schüttel-Frequenz angezogen. Zur Restriktionsanalyse von Plasmid-DNS wurden die Kulturen im Volumen von 3 ml, für die Gewinnung von Plasmid-DNS zur DNS-Sequenzierung in Volumina von 50 ml angesetzt. Lagerung und Selektion erfolgte auf Agarplatten.

Für Enzym-Präparationen von rekombinanten Enzymen wurden die Anzuchten in größerem Maßstab durchgeführt. Zur Kultivierung wurden 5 x 1 l-Kolben oder ein 20 l-Anzuchtbehälter eingesetzt, wobei die Dampf-Sterilisierung des jeweiligen Mediums im Autoklaven bereits am Vorabend der Anzucht durchgeführt wurde, um das Medium am nächsten Morgen im noch temperierten Zustand direkt verwenden zu können.

Das Wachstum der Kultur wurde durch Messungen ihrer optischen Dichte bei 590 nm verfolgt. Nach Erreichen einer OD₅₉₀ von 0,9 wurde die Expression des rekombinanten Enzymes durch Zugabe von IPTG induziert. Nach weiterer Inkubation für mindestens 3 und maximal 6 h wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 10 000 x g, 4° C) und bis zu ihrer Verwendung bei -80° C gelagert. Die Ausbeute betrug 3-5 g Nasszellen pro Liter Medium.

Je nach Selektionsmarker der rekombinanten *E. coli*-Stämme wurden die Kulturen in Gegenwart von 100 µg ml⁻¹ Ampicillin (Klon "Mfe-cDPGS-MAP-pjf" und "Mfe-cDPGS-MAP-RIL-pjf") oder 100 µg ml⁻¹ Ampicillin und 50 µg ml⁻¹ Kanamycin (Klon "Mfe-2-PGK-pET24a/cDPGS-pET15b") gezogen. Zur Stammhaltung wurden Zellen als Glycerin-Kulturen (10 % (v/v)) bei -80° C gelagert. Vor einer Neuanzucht erfolgte eine Vereinzelung des jeweiligen Klons auf Agarplatten in Gegenwart des entsprechenden Antibiotikums gleicher Konzentration, um damit eine Vorkultur animpfen zu können.

2.6 Molekularbiologische Untersuchungen mit DNS

2.6.1 Isolierung von genomischer DNS aus *Mt. fervidus*

Die Isolierung genomischer DNS aus Zellen von *Mt. fervidus* erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Meakin *et al.* (1991), einer Modifizierung der Methode von Weil *et al.* (1988).

Dazu wurden 1 g tiefgefrorene Zellen unter ständiger Zugabe flüssigen Stickstoffes in einem vorgekühlten Mörser gründlich zerrieben und anschließend in 10 ml Aufschlusspuffer (250 mM

Saccharose, 10 mM Tris (pH = 7,4), 10 mM EDTA, 1 % SDS (w/v)) resuspendiert. Nach Zugabe von $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Proteinase K ließen sich die Zell-Bruchstücke abzentrifugieren (15 min, $37\,000 \times g$, 4°C). Die im Überstand befindliche DNS wurde durch Zugabe von 10 ml eiskaltem Isopropanol und mindestens 30-minütiger Inkubation bei -20°C gefällt, in einer weiteren Zentrifugation (20 min, $18\,000 \times g$, 4°C) sedimentiert und dann in 5 ml Inkubationspuffer (50 mM Tris/HCl (pH = 8,0), 10 mM EDTA) aufgenommen. Nach schonender Resuspendierung wurde die DNS durch RNase-Verdau ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$, 60 min, 37°C), Proteinase K-Verdau ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$, 30 min, 37°C) und eine Phenol/Chloroform-Extraktion (s. Punkt 2.6.4) gereinigt. Nach Zugabe von 1 ml NH_4 -Acetat (10 M) und 2,5 Vol. Ethanol abs. wurde die DNS erneut 1 h bei -20°C gefällt, pelletiert (20 min, $18\,000 \times g$, 4°C), mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in 400 μl sterilem A. bidest. aufgenommen. Die Gesamtausbeute lag bei ca. $0,5 \text{ mg DNS g}^{-1}$ Nasszellen.

2.6.2 Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli* zur Restriktion und Klonierung

Zur Restriktion und Klonierung benötigte DNS wurde durch alkalische Lyse gereinigt. 1-2 ml Übernacht-Kultur wurde abzentrifugiert (60 s, $12\,000 \times g$), in 300 μl Puffer 1 (50 mM Tris (pH = 8), 10 mM EDTA, $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ RNase A) aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen lysiert, indem man sie nach Zugabe von 300 μl frisch angesetztem Puffer 2 (0,2 M NaOH, 0,1 % SDS) 5 min inkubierte. Durch Zugabe von 300 μl Puffer 3 (3 M K-Acetat (pH = 5,5)) und 20-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Fällung der genomischen DNS. Nach Zentrifugation (10 min, $12\,000 \times g$, 4°C) nahm man 800 μl Überstand ab, fällte die gereinigte DNS durch Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol, pelletierte (30 min, $20\,000 \times g$, 4°C) und wusch sie mit 1 ml EtOH (70 %). Nach vollständiger Trocknung des Pellet in der speedvac wurde das Pellet in 50 μl A. bidest aufgenommen. Anschließende Restriktionsanalysen konnten mit 10 μl der so gewonnenen Plasmid-DNS durchgeführt werden.

2.6.3 Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli* zur Sequenzierung

Plasmid-DNS, welche zur Sequenzierung eingesetzt werden sollte, wurde in 25 ml-Übernacht-Kulturen vermehrt und mit dem "Midi-Plasmid Kit" (Qiagen) nach dem Herstellerprotokoll verarbeitet.

2.6.4 Phenol/Choroform-Extraktion von DNS

Zur Trennung von DNS und Proteinen wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. (Sambrook *et al.*, 1989). Die DNS-haltige Lösung wurde mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 (v/v/v) versetzt, durch vortexen zu einer weisslichen Emulsion vermischt und zentrifugiert (20 min, $18\,000 \times g$, 4°C). Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein frisches Gefäß transferiert. Hierbei musste vermieden werden, Partikel der proteinhaltigen

Interphase mitzuführen. Dieser Vorgang wurde jeweils mit 1 Vol. Phenol/Chloroform (Verhältnis 1:1) und Chloroform wiederholt. Danach erfolgte die Präzipitation der DNS-haltigen Lösung (s. Punkt 2.6.5).

2.6.5 DNS-Präzipitation

DNS-Fällungen wurden mit Isopropanol oder Ethanol als Fällungsmittel nach Standardprotokoll durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989).

DNS-haltige Lösung wurde mit 1/5 Vol. NH_4 -Acetat (10 M) versetzt, mit 2,5 Vol. abs. Ethanol für 30 min bei -20°C gefällt und danach zentrifugiert (20 min, $37\,000 \times g$, 4°C). Um weitgehend entsalzte DNS zu erhalten, wurde 0,7 Vol. Isopropanol zugesetzt, 15 min bei RT inkubiert und wie oben zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert (5 min, $37\,000 \times g$, 4°C) und in sterilem A. bidest. aufgenommen.

2.6.6 Quantitative und qualitative Analyse von DNS

Die Konzentration von DNS in wässriger Lösung wurde photometrisch ermittelt (Photometer Philips 8720), wobei A. bidest. als Referenz diente. Eine wässrige Lösung von dsDNS und ssDNS bei 260 nm ergibt eine spezifische Extinktion:

$E_{260} = 1$ bei einer Konzentration von $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ dsDNS bzw. $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ ssDNS (Sambrook *et al.*, 1989). Die Lösung gilt als weitgehend frei von Phenol- oder Protein-Verunreinigungen, wenn der Quotient E_{260}/E_{280} grösser ist als 1,8.

Größen- und Mengenabschätzungen der Plasmid-DNS wurden durch einen Vergleich mit Standard-DNS (Gene Ruler, 1 kb, ready-to-use, MBI Fermentas) durchgeführt.

2.6.7 Agarose-Gel-Elektrophorese von DNS

Zur Mengen- und Größen-Abschätzung linearisierter Plasmid-DNS und von PCR-Produkten, der Kontrolle von DNS-Restriktionen und der präparativen Gewinnung von DNS-Fragmenten diente die Agarose-Gel-Elektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989).

Hierzu wurde, abhängig von der Fragmentgröße der aufzutrennenden DNS, eine Agarose-Konzentration zwischen 0,8 und 1,5 % in 1 x TAE (50 x = 2 M Tris/HCl, 0,25 M Na-Acetat, 50 mM EDTA, pH = 8,0) verwendet. Nachdem die Proben mit Probenpuffer (6 x = 0,2 % Bromphenolblau, 0,2 % Xylencyanol FF, 60 % Glycerin, 60 mM EDTA) versetzt wurden, erfolgte die Gel-Elektrophorese bei const. Spannung (60-100 V). Um die DNS sichtbar zu machen, wurden dem Agarosegel 2 μl einer Ethidiumbromidlösung (10 mg ml^{-1}) zugesetzt. Durch den in die DNS interkalierenden Farbstoff kann diese im Gel durch Anregung bei $\lambda = 254 \text{ nm}$ auf einem Transilluminator visualisiert werden. Als Größenstandard diente der Gene Ruler (1

kb DNA-Leiter, ready-to-use, MBI Fermentas). Die Gele wurden durch Photographie mit einer Sofortbild-Kamera dokumentiert.

2.6.8 Reinigung von DNS-Fragmenten

2.6.8.1 Extraktion von DNS aus TAE-Agarose-Gelen

Die präparative Gewinnung von DNS aus TAE-Agarose-Gelen wurde mit dem QIAquick-Gelextraktionskit nach Protokoll des Herstellers (Qiagen) durchgeführt. Das das interessierende DNS-Fragment enthaltende Gel-Stück wurde dazu bei 50° C komplett aufgelöst, unter Hochsalzbedingungen an einer Kieselgel-Matrix fixiert und nach Herstellerangaben gereinigt. Anschließend wurde die DNS unter Niedrig-Salzbedingungen (TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH = 8,0) von der Säule eluiert und im Spülpuffer vorhandenes Ethanol unter Vakuum in der Speedvac entfernt.

2.6.8.2 Reinigung von PCR-Produkten

Zur Reinigung und Konzentrierung von PCR-Produkten wurde der QIAquick PCR Purification Kit eingesetzt. Bis zu 10 µg DNS wurden dazu auf eine Kieselgel-Membran geladen, gewaschen und eluiert und in 40 µl TE (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH = 8,0) oder sterilem A. bidest eluiert. Anschließend erfolgte die Entfernung von im Spülpuffer befindlichem Ethanol durch Zentrifugation in einer Speedvac.

2.6.9 *In vitro*-Rekombination von DNS

2.6.9.1 Restriktion

Zur Restriktion von 1 µg DNS wurden 5 U der jeweiligen Restriktionsendonuclease nach Herstellerangaben (MBI Fermentas) eingesetzt. Die Inkubationsdauer aller Ansätze betrug 1 h bei 37° C.

2.6.9.2 Dephosphorylierung von restringierten DNS-Fragmenten

Generell wird bei der Ligation die Rezirkularisierung des Vektors gegenüber der Integration von Fremd-DNS bevorzugt. Um diesen Vorgang zu unterbinden, wurden die Vektoren mit kompatiblen Enden durch alkalische Phosphatase dephosphoryliert (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurde die Vektor-DNS nach kompletter Restriktion im Agarose-Gel aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert (s. Punkt 2.6.8.1). Nach Zugabe von 2 µl CIP-Puffer (10 x = 100 mM Tris/HCl (pH = 8,3), 10 mM ZnCl₂, 10 mM MgCl₂) und 0,25 U

alkalischer Phosphatase (CIP) wurde der Ansatz 30 min bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5 mM EDTA (pH = 8,0) und 0,5 % SDS gestoppt und danach die alkalische Phosphatase nach Zugabe von Proteinase K (50 µg ml⁻¹) 30 min bei 56° C abgedaut. Nach jeweils zweimaliger Extraktion mit Phenol und Phenol/Chloroform ließ sich die DNS mit 0,1 Vol. NaCl (3 M (pH = 7,0)) und 2 Vol. Ethanol abs. präzipitieren.

2.6.9.3 Ligation

Zur Ligation von restringierten Vektoren wurde T4-DNS-Ligase verwendet. Durch dieses Enzym werden unter ATP-Verbrauch kovalente Verknüpfungen benachbarter 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNS-Moleküle katalysiert. Es können hierbei sowohl komplementäre überhängende als auch - mit jedoch geringerer Ligationseffizienz - glatte Enden über Phosphodiester-Bindungen verknüpft werden. Die T4-DNS-Ligase wurde den Herstellerangaben (New England Biolabs) entsprechend eingesetzt. Kohäsive Enden von DNS-Fragmenten ließ man bei 4° C ü. N. ligieren (2 U T4-DNS-Ligase µg DNS-1), wobei das molare Verhältnis zwischen Vektor und zu inserierender DNS 1:3 betrug. Anschließend wurde die Reaktion durch 10-minütige Inkubation bei 70° C beendet.

2.6.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Nucleotid-Sequenzen können *in vitro* durch PCR (Mullis *et al.*, 1986) enzymatisch exponentiell amplifiziert werden. Durch die Sensitivität dieser Methode reichen einzelne DNS-Moleküle als Reaktionsvorlage aus. Es ist möglich, sowohl genomische DNS als auch in Vektoren inserierte DNS rasch und mit hoher Genauigkeit zu amplifizieren. Benötigt werden eine dsDNS-Vorlage und zwei Oligonucleotide, deren Sequenzen zu dem 5'- bzw. dem 3'- Ende der Vorlagen identisch bzw. revers komplementär sind. Eine thermostabile DNS-Polymerase kann diese Oligonucleotide als Primer für die DNS-Synthese (Saiki *et al.*, 1988) verwenden. Die PCR lässt sich in drei Schritte gliedern:

1. Denaturierung einer dsDNS-Vorlage bei 94° C
2. Zusammenlagerung von Template-DNS mit den Primern bei einer von Länge und Basen-Zusammensetzung des jeweiligen Primers abhängigen Temperatur
3. DNS-Polymerisation bei der für die Taq-Polymerase optimalen Temperatur von 72° C

Die Annealing-Temperatur von Oligonucleotiden ≤ 20 Nucleotiden wurde nach folgender Faustregel ermittelt:

$$(A/T) \times 2 + (G/C) \times 4 = \text{Annealing-Temperatur (Thein und Wallace, 1986)}.$$

2.6.10.1 Amplifikation genomischer DNS durch PCR

Amplifikationen von DNS mittels PCR wurden mit 100 ng Template-DNS und 20 pmol jedes Primers in Reaktionsvolumen von 25 µl mit 50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl (pH = 8,3), 200 µM dNTPs, 0,01 % (w/v) Gelatine und 1 U Taq Polymerase (MBI Fermentas oder Qiagen) durchgeführt. Nach einem ersten Denaturierungsschritt bei 80° C wurde MgCl₂ bis zu einer Endkonzentration von 1,5 M zugefügt. Danach erfolgten 30 Zyklen von je 1 min Inkubation bei 92° C, 1 min bei einer Primer-spezifischen Annealing-Temperatur zwischen 50 und 67° C und 1 min Inkubation bei 72° C.

2.6.10.2 PCR-Mutagenese

Zur Klonierung von cDPGS- und 2-PGK-Genen in die Expressionsvektoren pJF118EH, pET24a und pET15b wurden über PCR-Mutagenese zusätzliche Restriktionsschnittstellen eingeführt. Dafür wurde das PCR-High Fidelity-System (Boehringer) verwendet, welches einerseits die hohe Polymerisierungseffizienz der *Taq*-Polymerase und andererseits die Fehlerkorrektur-Aktivität der *Pyrococcus woesei*-Polymerase aufweist, um potentielle Fehler während der DNS-Amplifikation zu vermeiden. Diese PCR wurde wie oben beschrieben in einem Gesamtvolumen von 100 µl mit 100 pmol Primer und 0,75 µl High Fidelity-DNS-Polymerase durchgeführt.

2.6.11 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNS (modifiziert nach Hanahan, 1983)

2.6.11.1 Herstellung kompetenter Zellen

Um kompetente Zellen von *E. coli* zu erhalten (Sambrook *et al.*, 1989), impfte man 400 µl LB-Medium mit 1-2 ml einer Übernacht-Kultur an. Diese Kultur zog man bis zu einer OD₅₇₈ von 0,3-0,4 an (37° C, 200 Upm). Anschließend inkubierte man sie 10 min auf Eis und zentrifugierte sie ab (15 min, 1 000 x g, 4° C). Das in CaCl₂-Puffer (50 mM) resuspendierte Pellet wurde nochmals 10 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (5 min, 1 000 x g, 4° C). Danach löste man das Sediment vorsichtig in CaCl₂-Puffer (50 mM) und inkubierte es 30 min auf Eis. Nach wiederholter Zentrifugation (5 min, 1 000 x g, 4°C) nahm man die Zellen vorsichtig in 2 ml CaCl₂-Puffer auf, versetzte sie mit 300 µl Glycerin (100 % (v/v)) und fror sie, aufgeteilt in 100 µl-Aliquots, in flüssigem Stickstoff ein. Die Lagerung erfolgte bei -80° C.

2.6.11.2 Transformation

Zunächst wurden 100 µl kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, danach mit vollständig ligierter Plasmid-DNS vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 s bei 42° C erfolgte die Zugabe von 900 µl SOC-Medium (LB-Medium + 20 mM Glucose) und eine

Inkubation von 45 min bei 37° C. Zur Selektion der transformierten Zellen wurden anschließend 200 µl der Ansätze auf einer Agar-Platte je nach Bedarf mit Ampicillin (100 µg ml⁻¹) bzw. Ampicillin und Kanamycin (je 100 und 50 µg ml⁻¹) in LB (Sambrook *et al.*, 1989) ausplattiert. Diese Platten wurden ü. N. bei 37° C inkubiert. Die Identifikation rekombinanter Klone wurde durch die "Boiling PCR" durchgeführt.

2.6.12 Sequenzierung von DNS

DNS-Sequenzierungen wurden durch Service des medizinischen Fachbereichs der Universität Essen mit einem ABIPrism 377 Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA) von Frau Schmücker (Innere Klinik/Tumorforschung, AG Prof. Esche) oder von Fa. SequiServe (Vaterstetten) mit einem A.L.F. (Automated Laser Fluorescence)-Sequencer (Amersham Pharmacia, Freiburg) durchgeführt.

2.6.13 Software zur Auswertung molekularer Sequenzen

Chromas 1.45 (McCarthy, unveröffentlicht)

Die Ergebnisse der Sequenzierläufe des ABIPrism 377 Sequencer wurden auf einem Personal Computer visualisiert, wo sich die Sequenzdaten manuell editieren lassen und weiteren Analysen im FASTA-Format unterzogen werden können.

Clustal W (Version 1.7, Thompson *et al.*, 1994)

Mit Hilfe dieses Programmes wurden Sequenz-Alignierungen durchgeführt.

BLAST 2.0 (Altschul *et al.*, 1997)

Mit diesem im Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) ansteuerbaren Programm kann eine rasche Suche in DNS- und Protein-Sequenz-Datenbanken durchgeführt werden.

GENMON 4.4 (Gesellschaft für biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig)

Zur Vorhersage von Restriktionsfragmenten und die Übersetzung der DNS- in Aminosäure-Sequenzen konnte dieses Programm eingesetzt werden.

FASTA (Pearson und Lipman, 1988)

Mit diesem Programm ließen sich Aminosäure-Sequenzen vergleichen; die Software, welche auf einem Rechner des European Bioinformatics Institute (EBI) in Hinxton Hall, England, installiert ist, wurde mittels E-Mail aktiviert.

ExPASy (Appel *et al.*, 1994)

Der isoelektrische Punkt von Enzymen wurde mit Hilfe des Expert Protein Analysis Systems (ExPASy) ermittelt. Das auf dem Proteom Server des Schweizerischen Institutes für Bioinformatik (SIB) lokalisierte Programm ließ sich über die Internet-Adresse <http://www.expasy.org> abrufen.

2.7 Präparation der rekombinanten cDPGS von *Mt. fervidus*

2.7.1 Klonierung und heterologe Expression des *cpgS*-Gens

Nach der Präparation der genomischen DNS von *Mt. fervidus* (s. Punkt 2.6.1) konnte das cDPGS-codierende Gen durch Hybridisierung mit spezifischen Oligonucleotiden identifiziert werden. Die Oligonucleotid-Sequenzen (Probe 1: 5'- GARACNAARAARATGAT-3'; Probe 2: 5'- GAYGGNGARCAYTAYTTYCC-3') wurden von der vorher ermittelten N-terminalen Aminosäure-Sequenz abgeleitet (s. Punkt 2.15.10) und die Oligonucleotide entsprechend Hersteller-Angaben (Boehringer, Mannheim) an ihren 3'-Enden mit Digoxigen gelabelt. Die Übertragung genomischer DNS erfolgte durch Kapillar-Transfer auf Biodyne B-Nylon-Membranen (Pall). Unter Verwendung der Digoxigen-markierten Oligonucleotide wurden folgende Southern Blot-Analysen durchgeführt: a) bei 20° C mit 5 x SSC (1 x SSC: 0,15 M NaCl, 0,015 M Na-Citrat), anschließend bei 30° C mit 0,1 x SSC waschen und b) bei 28° C mit 5 x SSC und anschließend bei 41° C mit 0,5 x SSC waschen. Das stärkste Signal wurde bei einem 2,8-kb *DraII*-Fragment festgestellt, welches kloniert und in beiden Richtungen sequenziert wurde.

Zur Expression des *cpgS*-Gens in *E. coli* wurden durch PCR Mutagenese zwei neue Restriktionschnittstellen (*MunI* und *BamHI*) in die flankierenden Regionen des Gens unter Verwendung der Oligonucleotide 5'-GCTAAGGAGGCAATTGATGGGTGAAAC-3' und 5'-TATTGGATCCTTCAATATATCACCTAATTG-3' eingeführt. Dazu wurde eine PCR-Amplifikation unter Verwendung von Proof Reading Taq Polymerase mit diesen Primern durchgeführt (Annealing-Temperatur: 50° C). Nach Kontrolle durch ein 1 %-iges Agarosegel mit einem Teil der Ansätze wurden die PCR-Produkte mit dem "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und 2 h bei 37° C mit *MunI* und *BamHI* in Puffer B (Boehringer, Mannheim) in 70 µl Endvolumen restringiert. Danach wurde der gesamte Ansatz auf ein 1 %-iges Agarose-Gel aufgetragen, das Fragment ausgeschnitten und nochmals mit dem "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen, Hilden) gereinigt; die Ausbeute betrug ca. 200 ng. Diese Sequenz wurde durch Inkubation mit dem Expressionsvektor pJF118EH nach vorheriger Linearisierung mit entsprechenden Restriktionsenzymen 2 h bei RT ligiert. Nach Transformation von *E. coli* XL1 Blue wurden rekombinante Klone über Restriktionsanalyse identifiziert. Durch Sequenzierung beider DNS-Stränge wurde die korrekte Basen-Sequenz überprüft. Zur Expression wurde das

rekombinante Plasmid in *E.coli* BL21(DE3) transformiert. Die Zellen wurden in 50 %-iger Glycerin-Kultur bei -80° C gelagert.

2.7.2 Klonierung und heterologe Expression des *cpgS*-Gens in Gegenwart des *map*-Gens

Da eine N-terminale Sequenzierung der rekombinanten cDPGS (rcDPGS) eine nur inkomplette Prozessierung des N-terminalen Methioninrestes ergab, wurde das Methionaminopeptidase-Gen (*map*) aus *E. coli* (Sandman *et al.*, 1995) direkt hinter das *cpgS*-Gen unter Verwendung der Schnittstellen *Bam*HI und *Hind*III auf dem rekombinanten Plasmid pJF118EH eingefügt. Dazu wurden die Gen-Sequenzen zunächst mit entsprechenden Restriktionsenzymen linearisiert. Die Ansätze wurden durch ein 1 %-iges Agarose-Gel getrennt, ausgeschnitten und durch den "Qiaquick Gel Extraction Kit" (Boehringer, Mannheim) aus dem Gel eluiert. Die Ligation beider Sequenzen erfolgte anschließend 3 h bei 16° C. Danach wurde das Plasmid erneut in den Expressionsklon *E. coli* BL21(DE3) transformiert; rekombinante Klone wurden über Restriktionsanalyse identifiziert.

2.7.3 Klonierung und heterologe Expression des *cpgS*-Gens in Gegenwart des *map*-Gens und des RIL-Plasmids

Zur Verbesserung der heterologen Expression wurde der Expressionsstamm BL21-CodonPlus[®]-(DE3)-RIL mit dem *cpgS*- und *map*-Gen tragenden Plasmid pJF118EH transformiert. In diesem *E. coli*-Stamm befindet sich ein "RIL-Plasmid" mit zusätzlichen Kopien von tRNS für von *E. coli* selten genutzten Aminosäuren Arginin, Isoleucin und Leucin. Die Identifikation der rekombinanten Klone erfolgte über Restriktionsanalysen.

2.8 Analytische Methoden

2.8.1 Ionen-Chromatographie

Zur Detektion und Quantifizierung niedermolekularer anionischer Komponenten wurde die sog. HPIC (High Performance Ion Chromatography)-Analytik eingesetzt, bei der die Trennung der Anionen an Austauscher-Materialien niedriger Kapazität erfolgt. Als stationäre Phase wurde eine von der Fa. Dionex entwickelte Trennsäule AS-11 mit einer Vorsäule AG-11 verwendet. Die Vorschaltung eines Suppressors (ASRS Ultra II, Dionex) ermöglichte einerseits die hohe Grundleitfähigkeit der als Eluent fungierenden Elektrolyten (NaOH) vor Eintritt in die Leitfähigkeitsmesszelle auf chemischem Wege zu verringern und andererseits die zu analysierenden Anionen in eine stärker leitende Form zu überführen (Weiß, 1995). Prinzipiell erfolgt der Kationen-Austausch sowohl für den Eluenten als auch die nachzuweisenden Anionen

nach der Trennsäule und unmittelbar vor Eintritt in die Leitfähigkeitsmesszelle. Dabei werden die Analyten in ihre anorganischen Mineralsäuren überführt, die in der Regel eine stärkere Leitfähigkeit aufweisen. Die Hydronium-Ionen des Eluenten werden in Wasser überführt, wodurch das Rauschsignal verringert wird. Der Suppressor erhöht somit die Sensitivität der Messung, da einerseits die Analytsignale verstärkt und andererseits die Eigenleitfähigkeit des Eluenten über weite Bereiche seiner Konzentration verringert werden.

2.8.1.1 Herstellung der Eluenten

Zur Herstellung der Eluenten wurde A. bidest. mit einem spezifischen Widerstand $\geq 17,8 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ verwendet.

Eluent A, A. bidest.: 2 l des oben beschriebenen A. bidest. wurden 15 min mit Helium (4.6) im offenen Eluenten-Behälter entgast.

Eluent B, 250 mM NaOH: 1975,2 ml A. bidest. wurden ebenfalls 15 min mit Helium entgast, anschließend erfolgte die Zugabe von 24,8 ml 50 %-iger (w/v) NaOH. Nach weiterer 5-minütiger Entgasung waren die Lösungen einsatzbereit.

2.8.1.2 Probenvorbereitung

Um einer Verstopfung der Trennsäulen vorzubeugen, mussten die Proben entproteiniert werden. Zunächst wurden Fällungsvorversuchen mit Aceton, Ethanol und Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt. Dabei stellte sich die TCA-Fällung als die beste Methode bez. der Fällungseffektivität und der Wiederfindungsrate heraus. Kontrollen mit 200 μM cDPG und 3,5 mg ml^{-1} rekombinanter hitzegefällter cDPGS als Modellschubstanz ergaben eine Wiederfindungsrate von 92 % (TCA), 84 % (Aceton) und 81 % (Ethanol) für die niedermolekulare Substanz. Nach SDS-PAGE (s. Punkt 2.15.5) zeigten TCA-gefällte Proben der Überstände keine, Aceton- und Ethanol-präzipitierte Proben noch schwache Protein-Signale auf. Daher wurden die Fällungen mit TCA durchgeführt: Nach 1 h Entproteinierung von 37,5 μl Probe durch Inkubation mit 16 μl eiskalter 20 %-iger (w/v) TCA auf Eis wurde der Ansatz zentrifugiert (15 min, 20 000 $\times g$, 4° C) und anschließend 40 μl des Überstandes mit 7 μl 2 N NaOH neutralisiert. Hiervon konnten in Abhängigkeit der Konzentrationen je 20 μl unterschiedlicher Verdünnungen ionenchromatographisch vermessen werden.

2.8.1.3 Gerätekonfiguration und Elutionsbedingungen

Zur Analyse niedermolekularer anionischer Verbindungen standen eine Vorsäule AG11, eine Analysensäule AS11, ein Suppressor ASRS Ultra II, ein UV/VIS Detektor VDM2 und ein Autosampler GINA 50 T zur Verfügung. Proben-Applikation und -Analyse erfolgten über die

Software PeakNet[®] 6.2. Zunächst wurden 20 µl einer bei 5° C gekühlten Probe über den Autosampler injiziert und im Verlauf der Analyse nacheinander die Gradientenpumpe und der elektro-chemische Detektor des Chromatographie-Systems DX500 angesteuert. Der Detektor wurde auf einen Messbereich von 5 µS eingestellt und zu Beginn der Messung ein von der Software bezüglich der Leitfähigkeit und des UV₂₆₀-Signals gesteuerter Nullabgleich durchgeführt. Die Elution der Solute erfolgte durch einen NaOH-Gradienten bei RT und einer Flussrate von 1 ml min⁻¹; der Suppressor arbeitete im Autosuppressionsmodus bei einer Stromstärke von 100 mA. Die Säule wurde im Anschluß an die jeweiligen Messungen zur Regeneration 2 min mit 250 mM NaOH gespült und anschließend 12 min mit den Elutionsstartbedingungen von 25 mM NaOH reäquilibriert.

2.8.1.4 Trennung von cDPG, DPG, ADP und ATP

Die Auftrennung dieser durch die cDPGS umgesetzten Verbindungen wurde durch einen nicht-linearen NaOH-Gradienten realisiert. Innerhalb der ersten drei Minuten wurde die Ausgangskonzentration der NaOH von 25 auf 50 mM linear verdoppelt. Anschließend erfolgte die Absenkung der Eluenten-Konzentration über 5 min mit einem konkaven Elutionsprofil auf 37,5 mM; diese Konzentration wurde für 2 min const. gehalten, wonach die oben beschriebene Spül-Sequenz zur Regeneration der Säule eingeleitet werden konnte. Verglichen zum linearen Gradienten bedingt der verwendete konkave Gradient im Vergleichszeitraum eine anfänglich geringere Änderung der Eluenten-Konzentration. Im weiteren Verlauf tritt jedoch eine Änderung der Steigung ein mit dem Resultat, dass zum Ende hin eine verglichen zum linearen Gradienten rasche Änderung der Eluenten-Zusammensetzung durchgeführt wird. Der konkave Gradient ist eine Möglichkeit zur Auflösung von Anionen mit ähnlichem Elutionsverhalten bzw. ähnlichen Retentionszeiten.

2.8.1.5 Kalibrierstandard

Zur quantitativen Bestimmung wurden Kalibrierstandards unterschiedlicher Konzentrationen herangezogen und die Retentionszeiten bestimmt (s. Tab. 2).

Tab. 2: Kalibrierstandard für Ionen-Chromatographie.

Komponente	Konzentrationen [µM]			Retentionszeiten [min]
	1	2	3	
cDPG	200	100	50	6,6
ADP	200	100	50	7,1
DPG	120	60	30	9,2
ATP	140	70	35	9,6

2.8.2 cDPG-Detektion durch Dünnschicht-Chromatographie

Zur einfachen Differenzierung der im Lauf von Aufreinigung und enzymatischer Analyse des niedermolekularen Soluts auftretenden ATP-, ADP-, 2-PG-, 3-PG-, DPG- und cDPG-haltigen Proben wurden 2 µl-Aliquots auf eine Startlinie einer Cellulose-Dünnschicht-Chromatographieplatte (20 x 20 cm, ohne Fluoreszenzindikator, Schichtdicke 100 µm, Merck) aufgetragen. Nachdem die Proben getrocknet waren, erfolgte die Entwicklung der Dünnschichtplatte für 4 h unter gesättigter Gasphase; das Laufmittel (100 ml) bestand aus einem Gemisch aus Ethylacetat, Essigsäure, Wasser und Ammoniak (6 : 6 : 2 : 1). Anschließend wurde die unter einem Abzug getrocknete Platte mit Hanes-Reagenz gleichmäßig besprüht. Nachdem die Platte erneut getrocknet war, konnte sie nach kurzer Entwicklung unter Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 366$ nm ausgewertet werden. Dazu wurden die R_f -Werte für die aufgetragenen Substanzen ermittelt, die definiert sind als Quotient aus der Wanderungsstrecke der Probe W_P und des Laufmittels W_L :

$$R_f = \frac{W_P}{W_L}$$

Präparation von Hanes-Reagenz:

Zunächst wurden 0,5 g Ammonium-Molybdat in 5,1 ml A. bidest. gelöst, danach 1 ml 37 %-ige Salzsäure (HCl (w/v)) und 2,9 ml 60 %-ige Perchlorsäure (HClO₄ (w/v)) zugefügt und der Ansatz bis zum Endvolumen von 50 ml mit Aceton aufgefüllt. Vor Gebrauch wurde die Lösung ü. N. bei 4° C gelagert.

2.8.3 Enzymatische Messung der cDPGS-Aktivität

Das durch die Aktivität der cDPGS synthetisierte cDPG konnte nach seiner Überführung in DPG enzymatisch quantifiziert werden, indem es durch eine Enzymkaskade zu Glycerinphosphat umgesetzt wird, wobei eine photometrisch messbare und der DPG- bzw. cDPG-Konzentration proportionale NADH-Oxidation stattfindet. Zunächst wurden 40 µl der cDPGS-Lösung mit 10 µl einer 5-fach konzentrierten Substratmischung (5 x: 250 mM TES, 250 mM DPG, 50 mM ATP, 50 mM MgCl₂, 2 500 mM KCl (pH = 6,5 bei 83° C)) über 5 – 30 min bei 83° C inkubiert. Anschließend wurde verbliebenes DPG mit saurer Phosphatase (Sweet Potatoe, Sigma) hydrolysiert (1 h, 37° C, Puffer: 0,5 M Na-Acetat (pH = 4,8)). Zur Analyse von cDPG wurde die Verbindung anschließend durch saure Bedingungen zu DPG hydrolysiert, indem man den DPG-freien Ansatz mit 200 µl 1 M HCl versetzte und 15 min bei 100° C inkubierte. Danach wurde die Probe mit 150 µl NaCO₃ neutralisiert und anschließend das durch die cDPG-Hydrolyse entstandene DPG nach der Methode von Lehman *et al.* (1990a) unter Verwendung des Boehringer Test Kits quantifiziert.

Die Testmischung zur photometrischen Endpunktbestimmung wurde mit 1 ml-Glasküvetten in einem Philips Photometer wie folgt durchgeführt:

Lösung 2	25 µl
Lösung 3	25 µl
Probe (pH = 7)	maximal 90 µl
DPG-Testpuffer	ad 1 000 µl

Nach Zugabe der Lösung 2 und 3 wurde zunächst im Ansatz befindliches Substrat entfernt; nach 5-minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Ermittlung der Ausgangsextinktion E_1 (340 nm). Danach wurde die eigentliche Messung gestartet:

Lösung 4	10 µl
Lösung 5	10 µl

Nach 30-minütiger Inkubation (RT) wurde die Endextinktion E_2 bestimmt.

Analog dazu konnte die Aktivität der 2-PGK gemessen werden: Dazu wurden 40 µl der Enzymlösung mit 10 µl einer 2-PG-haltigen Substratmischung (5 x: 250 mM TES, 25 mM 2-PG, 100 mM ATP, 100 mM $MgCl_2$ (pH = 6,5 bei 83° C)) über 5-30 min bei 83° C inkubiert. DPG als Produkt der 2-PGK-Reaktion ließ sich unter Verwendung des obigen Quantifizierungstests direkt vermessen.

Zusammensetzung der Testlösungen:

Lösung 1 (DPG-Testpuffer): Tri-Ethanolamin 48 mM (pH = 7,6); $MgCl_2 \times 6 H_2O$ 5,3 mM; EDTA 5,2 mM

Lösung 2: 9,6 mM NADH, 40 mM ATP in DPG-Testpuffer

Lösung 3: Phosphoglyceratmutase (PGM, 14 U ml^{-1}); Phosphoglyceratkinase (PGK, 940 U ml^{-1}); Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, 28 U ml^{-1}); Triosephosphat-Isomerase (TIM, 500 U ml^{-1}); α -Glycerinphosphatdehydrogenase (GDH, 130 U ml^{-1}) in DPG-Testpuffer

Lösung 4: Phosphoglyceratmutase (880 U ml^{-1}) in DPG-Testpuffer

Lösung 5: 2-Phosphoglycolat 48 mM in H_2O

Das in Lösung 5 enthaltene Phosphoglycolat löst eine Nebenaktivität der in Lösung 4 im Überschuß vorhandenen PGM aus, welche aus DPG 3-Phosphoglycerat synthetisiert, das dann seinerseits in der Enzymkaskade unter photometrisch detektierbarer NADH-Oxidation metabolisiert wird. In Lösung 3 ist die Konzentration der PGM für diese Dehospholisierungsreaktion zu gering.

In Anlehnung an das Lambert-Beer'sche Gesetz lässt sich die DPG-Konzentration nun wie folgt ermitteln:

$$E_1 - E_2 = \Delta E \qquad [DPG] = \frac{\Delta E}{\varepsilon \cdot 2 \cdot \text{Vol.}}$$

ε_{NADH} bei 340 nm = 6,3 [l mmol⁻¹ cm⁻¹], Vol. entspricht dem eingesetzten Probenvolumen [ml].

Reaktionen der Enzymkaskade:

Enzyme:

DPG + H₂O → 3-Phosphoglycerat + P_i

PGM

3-Phosphoglycerat + ATP → 1,3-Diphosphoglycerat + ADP

PGK

1,3-Diphosphoglycerat + NADH → Glycerinaldehyd-3-phosphat + NAD⁺ + P_i

GAPDH

Glycerinaldehyd-3-phosphat → Dihydroxyacetonphosphat

TIM

Dihydroxyacetonphosphat + NADH → α-Glycerinphosphat + NAD⁺

GDH

Pro Mol cDPG im Ansatz werden 2 Mol NADH umgesetzt.

2.8.4 Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)

Die Aufnahmen der ¹H-, ¹³C- und ³¹P-Spektren erfolgte mit dem Spektrometer DRX-500 der Firma Bruker. Die ¹³C-NMR Spektren sind ¹H-breitbandentkoppelt (125,7 MHz) und die ³¹P-NMR Spektren wurden ¹H-breitbandentkoppelt (200,4 MHz) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf D₂O (¹H-NMR) als internen bzw. H₃PO₄ (³¹P-NMR) als externen Standard und sind in δ-Werten angegeben. Die Signalmultiplizitäten wurden mit folgenden Symbolen markiert:

s (Singulett), d (Dublett) und t (Triplett)

2.9 Gewinnung von cDPG

2.9.1 Isolierung von cDPG aus *Mt. fervidus*

Zur quantitativen Extraktion von cDPG aus *Mt. fervidus* wurden 5 g Zellmasse mit 50 ml eiskaltem A. bidest und 1,5 ml 70 %-igem (w/v) Perchlorat versetzt und 20 min in einem Eisbad gerührt. Danach wurde die Suspension zentrifugiert (20 min, 37 000 x g, 4° C) und der Überstand entnommen. Danach erfolgten die Neutralisation des Überstandes mit konzentrierter NaOH und die Entfernung des dabei ausfallenden Kaliumperchlorates durch nochmalige Zentrifugation (10 min, 37 000 x g, 4° C). Nach Zugabe von 2 Vol. A. bidest wurde mit der cDPG-haltigen Lösung - analog zur Vorgehensweise bei dem *in vitro* synthetisierten Soluten (s. Punkt 2.9.2.2) - eine säulenchromatographische Aufreinigung unter Verwendung von Q-Sepharose durchgeführt.

2.9.2 *In vitro*-cDPG-Synthese mit rekombinanter cDPGS

2.9.2.1 Ermittlung der Temperatur-Abhängigkeit des Reaktionsgleichgewichtes der cDPGS-Reaktion

Für Stabilitätsuntersuchungen an verschiedenen Enzym-Proteinen in Gegenwart von cDPG wurde die niedermolekulare Komponente mit Hilfe der rekombinanten cDPGS *in vitro* synthetisiert. Für eine optimale Ausbeute wurde zunächst die Temperatur-Abhängigkeit des Reaktionsgleichgewichtes der cDPGS-Reaktion ermittelt. Zur Bestimmung der cDPG-Ausbeute bei der enzymatischen *in vitro*-Synthese unter Verwendung hitzegefällter rekombinanter cDPGS wurde eine Quantifizierung der Produkte nach Gleichgewichtseinstellung bei 30 bis 50° C in Abstufungen von 5° C durchgeführt.

Unter Verwendung der Reaktionsgleichung



lässt sich mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes die Gleichgewichtskonstante K ermitteln:

$$K = \frac{[\text{cDPG}][\text{ADP}][\text{P}_i]}{[\text{DPG}][\text{ATP}]}$$

Nach enzymatischer Quantifizierung (s. Punkt 2.8.3) von DPG und cDPG ließen sich die Mengen von äquimolar umgesetztem ATP und ADP ableiten, die zur Berechnung von K in den obigen Quotienten eingesetzt wurden. Die für den gewählten Temperatur-Bereich bezogen auf die cDPG-Ausbeute optimale Reaktionstemperatur kann graphisch durch die Auftragung des Logarithmus von K gegen den Logarithmus der Temperatur in Kelvin ermittelt werden (van't Hoff-Plot).

2.9.2.2 Durchführung der *in vitro*-cDPG-Synthese

Um die cDPG-Ausbeute zu steigern, wurde stets frisch aufgeschlossenes (Aufschlusspuffer: 10 mM TES/KOH (pH = 7), 500 mM KCl, 1 mM MgCl₂ x 6 H₂O, 7 mM DTT) und hitzegefälltes Enzym eingesetzt (s. Punkt 2.10.2). Diesem Ansatz wurden im Anaeroben-Zelt DPG, ATP und MgCl₂ bis zu einer Endkonzentration von 50 mM in einer Schottflasche zugefügt und anschließend anaerob bei 30° C ü. N. inkubiert; der Umsatz von DPG und ATP zu cDPG und ADP verläuft nicht vollständig. DPG, ATP und ADP wurden nach Beendigung der Inkubation mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase aus dem Ansatz entfernt, um die folgende Aufreinigung des cDPG zu vereinfachen. Dazu wurden der pH-Wert der Lösung durch Zugabe des gleichen Volumens eines Puffers (0,2 mM Tris (pH = 8,4) und 5 mM MgCl₂) angehoben, 20 U alkalische

Phosphatase pro ml Ansatz zugefügt und erneut mindestens 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach anschließender Neutralisation mit Essigsäure ließ sich dabei ausfallende alkalische Phosphatase abzentrifugieren (Ausschwing-Rotor, 5 min, 5 000 Upm). Der Ansatz wurde auf eine Q-Sepharose (1,6 x 10 cm, Flussrate 0,4 ml min⁻¹, äquiliibriert mit 10 mM NH₄-Acetat (pH = 5,5)) aufgetragen. Nachdem die Säule mit 3 Bettvolumen dieses Puffers gespült wurde, erfolgte die Elution von cDPG unter Anlage eines linearen NH₄-Acetat-Gradienten (10 mM – 1 M). Die niedermolekulare Substanz ließ sich bei einer Konzentration von ca. 800 mM NH₄-Acetat nachweisen. Zur weiteren Reinigung wurden die vereinten cDPG-haltigen Proben in einem Rotationsverdampfer eingeeengt und danach in ein möglichst geringes Volumen A. bidest aufgenommen. Das für weitere Experimente störende Acetat ließ sich durch Gelfiltration entfernen (Sephadex G10, 88 x 3,8 cm, Flussrate 1,8 ml min⁻¹): Nach der Applikation einer Probe (Gesamtvolumen maximal 10 ml) auf die Säule ließ man diese unter Normaldruck in das Säulenbett einsickern. Im Anschluss an dreimaliges Nachspülen mit je 10 ml A. bidest erfolgte die Elution mit A. bidest bei const. Flussrate. Dabei wurden Fraktionen mit einem Volumen von 10 ml gesammelt und durch Ionen-Chromatographie identifiziert. Acetatfreie cDPG-Fraktionen wurden nochmals im Rotationsverdampfer bei 30° C i. Vak. bis zur Trockne eingeeengt und in A. bidest aufgenommen. Das Kaliumsalz des cDPG hatte sich in vorherigen Experimenten (Lehmacher und Hensel, 1990b) als die effektivste Variante bei Stabilitätsversuchen herausgestellt. Daher wurde die Lösung über mit 10 Vol. A. bidest gereinigtes DOWEX 50W x 4 (2 g Material mg⁻¹ cDPG) abgenutscht und durch anschließende Neutralisation mit 10 M KOH in die Kaliumform überführt.

2.9.3 *In vivo*-cDPG-Synthese mit rekombinanter cDPGS und 2-PGK in *E. coli*

Da cDPG in *Mt. fervidus* ein Produkt eines Embden-Meyerhof-Parnas-Seitenweges ist, wäre es denkbar, dass auch *E. coli* die niedermolekulare Substanz produzieren könnte, wenn die notwendigen Enzyme zur Verfügung stünden. Der experimentelle Ansatz bestand in der Co-Transformation der Gene *2pgk* und *cpgS* aus *Mt. fervidus* in *E. coli*. Dabei wurden die Gene aus der genomischen DNS unter parallelem Einbau geeigneter Restriktionsschnittstellen (2-PGK: *Nde*I und *Bgl*II, cDPGS: *Nco*I und *Bam*HI) durch PCR-Mutagenese amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden restringiert und in pET24a (für *2pgk*, enthält Kanamycin als Resistenzmarker) und pET15b (für *cpgS*, enthält Ampicillin als Resistenzmarker) inseriert. Beide Plasmide waren ebenfalls restringiert und phosphoryliert. Anschließend erfolgte die Transformation der rekombinanten Plasmide einzeln in kompetente *E. coli* DH5α und die Identifikation rekombinanter Klone durch Restriktionsanalysen. Zur heterologen Expression wurden kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen zunächst getrennt mit den Plasmiden pET24a+*2pgk* bzw. pET15b+*cpgS* transformiert. Die Kontrolle der Expression von aktiven heterologen Enzymen erfolgte durch Aktivitätsmessungen (s. Punkt 2.8.3). Schließlich wurden beide Plasmide in *E. coli* BL21(DE3) co-transformiert und die Expression durch SDS-Gel-Analysen bzw.

Aktivitätstests kontrolliert. Die Bildung von *in vivo* synthetisiertem cDPG wurde nach Aufschluss der Zellen ionenchromatographisch ermittelt (s. Punkt 2.8.1).

Kenndaten:

C₃H₃K₃O₉P₂ (362,3)

¹H-NMR (D₂O, 500 MHz): δ = 4,23 (dd; ²J_{H-b, H-b'} = 12,5 Hz, ³J_{H-a, H-b'} = 10,0 Hz, 1H, H-b'), 4,34 (dd; ²J_{H-b, H-b'} = 12,5 Hz, ³J_{H-b, H-a} = 2,2 Hz, 1H, H-b), 4,72 (dd; ³J_{H-a, H-b'} = 10,0 Hz, ³J_{H-a, H-b} = 2,2 Hz, 1H, H-a).

¹³C-NMR (D₂O, 125,7 MHz): δ = 70,02 (d; C-3), 80,53 (dd; C-2), 176,43 (d; C-1).

³¹P-NMR (D₂O, 202,41 MHz): δ = -10,5 (d; ²J_{P-α, P-β} = 18,1 Hz; 1P, P_α), -9,2 (d; ²J_{P-α, P-β} = 18,1 Hz; 1P, P_β).

2.10 Chromatographische Aufreinigung der cDPGS

2.10.1 Aufreinigung der cDPGS aus *Mt. fervidus*

Zur Vermeidung von Oxidationsartefakten wurden alle Aufreinigungsstufen, mit Ausnahme der Chromatographie über Reactive Green 19 (s. Punkt 2.10.1.4), in der Anaeroben-Kammer (Coy) in Gegenwart von 5 mM DTT als Reduktionsmittel durchgeführt. Die Chromatographie über Reactive Green 19 erfolgte im Kühlraum in Gegenwart von 7,5 mM DTT.

2.10.1.1 Aufschluss der Zellen

Die zum Aufschluss verwendete French Press Zelle und die Zentrifugationsröhrchen wurden vor Verwendung mit N₂ geflutet. Die Phenylsepharose-Chromatographie, die Hydroxylapatit-Chromatographie und die Dialysen erfolgten bei RT im Anaeroben-Zelt, lediglich der letzte Chromatographie-Schritt über Reactive Green 19 wurde bei einer Temperatur von 4° C aerob durchgeführt. Nach ihrer Identifikation wurden die cDPGS-Fraktionen kühl und anaerob gelagert.

Nachdem zunächst 10 g Zellen in 15 ml Aufschlusspuffer (10 mM TES/KOH (pH = 7), 1 mM MgCl₂, 5mM DTT) mit 500 mM KCl suspendiert und durch 5-malige Passage in der French Press bei 1260 psi (87 bar) aufgeschlossen wurden, ließen sich die Zellbruchstücke durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 38 000 x g, 4° C entfernen.

2.10.1.2 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie

Um eine Bindung an die Säulenmatrix zu ermöglichen, wurde die KCl-Konzentration des Überstandes auf 3 M erhöht und dieser Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran folgte eine erneute 30-minütige Zentrifugation bei 38 000 x g, 4° C. Der Überstand wurde auf eine mit Aufschlusspuffer (inclusive 3 M KCl) äquilibrierte Phenylsepharose ff (1,9 cm x 12 cm, Flussrate 1,5 ml min⁻¹) appliziert. Nach mehreren Spülpassagen mit diesem Äquilibrationpuffer legte man einen 700 ml umfassenden linearen Gradienten des Puffers von 3 M auf 0 M KCl an. Das Enzym eluierte bei einer KCl-Konzentration von ca. 600 mM. Die entsprechenden Fraktionen wurden gepoolt und gegen 3 x 500 ml Dialyse-Puffer (50 mM Kaliumphosphat mit 250 mM KCl und 5 mM DTT (pH = 6,5)) dialysiert.

2.10.1.3 Hydroxylapatit-Säulen-Chromatographie

Das Dialysat wurde auf eine Hydroxylapatit ff (1,6 cm x 8 cm, Flussrate 0,5 ml min⁻¹, äquilibriert in 150 mM Kaliumphosphatpuffer und 5 mM DTT (pH = 6,5)) mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml min⁻¹ aufgetragen. Nachdem die Säule mit 10 Bettvolumen mit diesem Puffer gespült wurde, konnte das Enzym unter Anlage eines linearen Phosphat-Gradienten (150 - 350 mM) eluiert werden (Gesamtvolumen: 1,5 l). Das Protein wurde bei einer Kaliumphosphat-Konzentration von 275 mM Kaliumphosphat eluiert und vor seiner Weiterverwendung gegen Aufschlusspuffer mit 300 mM KCl und 7,5 mM DTT dialysiert.

2.10.1.4 Affinitäts-Chromatographie

Das homogene Protein konnte durch nachfolgende Chromatographie mit einer Farbstoff-Säule gewonnen werden. Dazu wurde das Dialysat auf eine Reactive Green 19 (0,8 cm x 5 cm, Flussrate 0,2 ml min⁻¹, maximale Ladekapazität 0,4 mg Prot. ml⁻¹, äquilibriert mit Aufschlusspuffer (inclusive 300 mM KCl)) bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,2 ml min⁻¹ aufgetragen. Nachdem die Säule mit jeweils 10 Säulenvolumen des Äquilibrationpuffers und anschließend 15 ml dieses Puffers mit 450 mM KCl gespült wurde, erfolgte die Elution der cDPGS durch stufenweise Erhöhung der KCl-Konzentration auf 530 mM, 600 mM und 700 mM KCl.

2.10.2 Präparation der rekombinanten cDPGS von *Mt. fervidus*

Die Enzymproduktion rekombinanter cDPGS des Expressionsstammes wurde bei einer OD₅₇₈ = 0,9 durch Zugabe von IPTG induziert. Für kinetische Vergleichsmessungen mit cDPGS aus *Mt. fervidus* wurde das rekombinante Enzym nach dem gleichen Verfahren wie dort aufgereinigt (s. Punkt 2.10.1). Für Modifikationsstudien, *in vitro*-cDPG-Produktionen und die Gewinnung von

Antikörpern konnte eine verkürzte Aufreinigungsprozedur durchgeführt werden. Dabei wurden 5 g Zellen in 7,5 ml Aufschlusspuffer, der 300 mM KCl und 5 mM DTT enthielt, suspendiert und durch fünf Passagen in einer French Press Zelle bei 1260 psi (87 bar) aufgeschlossen. Die Entfernung der Zellbruchstücke erfolgte durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 38 000 x g und 4° C. Nach 30-minütiger Inkubation bei 75° C und anschließender Abkühlung auf Eis wurde die Zentrifugation wiederholt. Der Überstand konnte analog zur Aufreinigung des Enzymes aus *Mt. fervidus* (s. Punkt 2.10.1.4) durch eine Säulen-Chromatographie unter Verwendung von Reactive Green 19 bis zur Homogenität aufgereinigt werden.

2.11 Untersuchungen zur Charakterisierung der cDPGS-Isoformen aus *Mt. fervidus*-Zellen

Um das Auftreten zweier Isoformen der cDPGS aus *Mt. fervidus*-Zellen im SDS-Gel-Elektropherogramm erklären zu können, wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Folgende Tests sollten darüber Aufschluss geben, ob es sich bei den beobachteten Isoformen um Konformere oder um Protein-Varianten mit unterschiedlicher chemischer Struktur handelt:

1. Test auf Vorliegen verschiedener Konformere

Um zu untersuchen, ob Konformationsänderungen Ursache für das Auftreten der cDPGS-Doppelbande sein könnten, wurden 45 µg cDPGS aus *Mt. fervidus*-Zellen in 10 mM TES/KOH-Puffer (pH = 7) sowohl in Gegenwart von 10 M Harnstoff als auch in Gegenwart von 10 M Guanidinhydrochlorid 2 h bei 90° C inkubiert. Nach anschließender Dialyse gegen 10 mM TES/KOH (pH = 7), 500 mM KCl, 1 mM MgCl₂ und 5 mM DTT wurden die Proben gelelektrophoretisch analysiert.

2. Test auf Phosphorylierung durch Behandlung mit saurer und alkalischer Phosphatase

40 µg cDPGS aus *Mt. fervidus* wurden in 0,5 M Na-Acetat (pH = 4,8) in Gegenwart von 2 und 10 U saurer Phosphatase aus Süßkartoffel und 2, 10 und 100 U saurer Phosphatase aus Weißkartoffel 1 h bei 37° C inkubiert. Analog dazu wurden 40 µg des Enzymes in 0,1 M Glycin, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂ (pH = 10,5) mit 25 und 100 U alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm je 1 h Stunde bei 37° C inkubiert. Anschließend erfolgte eine gelelektrophoretische Analyse.

3. Test auf Bildung eines Phosphoryl-Intermediates

Um zu prüfen, ob eine der beiden Isoformen ein Phosphoryl-Intermediat darstellen könnte, das während der enzymatischen Reaktion gebildet wird, wurde die cDPGS-Reaktion mit rekombinantem Enzym in Gegenwart von (γ -³²P)-ATP durchgeführt. Dazu wurden 10 µl des 5 x Substratmixes mit 40 µl cDPGS (13 µg ml⁻¹) und 0,2 µl (γ -³²P)-ATP (4500 Ci mol⁻¹) inkubiert (20 min, 75° C) und per SDS-PAGE aufgetrennt. Das gefärbte Gel wurde getrocknet und anschließend autoradiographiert (Expositionszeit 4 Tage).

4. Test auf Vorliegen einer ADP-Ribosylierung

Zur Kontrolle einer potentiellen ADP-Ribosylierung des Enzymes wurde ein cDPGS-Aliquot (40 µg) mit 33 mM Trizma (pH = 8,8), 30 mM Mg-Acetat und 3,3 mM (NH₄)₂-Acetat in Gegenwart von 0,03 und 3 mU Phosphodiesterase (Rind) 1 h bei 37° C inkubiert. Analog dazu wurde ein Aliquot unter alkalischen Bedingungen (Puffer: 0,1 M CHES (pH = 9,9)) in gleicher Weise inkubiert. Danach fand eine gelelektrophoretische Analyse statt.

5. Test auf Glycosylierung

Das Vorliegen von Glycosylresten wurde mit Hilfe des Immun Blot-Kits zur Detektion von Glyco-Proteinen (Biorad, München) durchgeführt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung von 5 µg cDPGS-Fractionen wurde das Elektropherogramm auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet (s. Punkt 2.15.6). Die nachfolgenden Inkubationen der Membran wurden bei RT unter leichtem Schwenken durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran für 10 min mit PBS-Puffer (9 mM Natriumphosphat (pH = 7,2), 27 mM Natriumchlorid) und danach 20 min im Dunkeln in 10 ml Natriumperjodat-Lösung (100 mM Natriumacetat (pH = 5,5), 10 mM Natriumperjodat, 5 mM EDTA) inkubiert. Nach Waschen der Membran (3 x PBS-Puffer je 10 min) wurde die Biotinylationslösung (Biorad, München) appliziert, 1 h inkubiert und dann mit TBS-Puffer (50 mM Tris (pH = 7,2), 27 mM Natriumchlorid) gespült (3 x 10 min). Nach 30-minütiger Behandlung mit 10 ml Blockierungslösung (Biorad, München) erfolgte ein erneuter Spülzyklus mit TBS-Puffer (3 x je 10 min), Zugabe eines Streptavidin-Alkalische Phosphatase Konjugates und eine 60-minütige Inkubation. Im Anschluss an die Spül-Sequenz (TBS-Puffer, 3 x 10 min) wurde die Entwicklungslösung (Biorad, München) zupipettiert und die Membran 30 min ohne Schwenken entwickelt. Die Entwicklung wurde mit A. bidest. abgestoppt und die Membran luftgetrocknet. Als Positivkontrolle diente ein biotynilierter Molekularmassen-Standard (Biorad, München).

2.12 Modulation der cDPGS-Aktivität durch Stoffwechsel-Metabolite

Zur Ermittlung des allosterischen Regulationspotentials der cDPGS wurden Enzym-Fraktion der Hoch- und Niedertemperatur-Variante (s. Punkt 2.15.2) mit halbsättigenden Konzentrationen von DPG und ATP versetzt. Nach der Zugabe von 3 mM verschiedener Metabolite wurden die pH-Werte kontrolliert, die Proben unter anaeroben Bedingungen 10 und 20 min bei 83 °C inkubiert und anschließend die gebildete cDPG-Menge quantifiziert (s. Punkt 2.8.1.2). Damit ließ sich ein Einfluss des jeweiligen Additivs auf die Aktivität der cDPGS in Syntheserichtung abschätzen. Die Messungen wurden mit folgenden Nucleotiden oder Zuckerphosphaten durchgeführt: NADP⁺, NADPH, NADH, Ribose-5-Phosphat (R-5-P), Fructose-1-Phosphat (F-1-P), Fructose-6-Phosphat (F-6-P), Glucose-1-Phosphat (G-1-P), Glucose-6-Phosphat (G-6-P), AMP, ADP, 3-Phosphoglycerat (3-PG) und PEP. Zur Ermittlung eines Vergleichswertes erfolgten Kontrollmessungen beider Enzym-Varianten ohne Additive unter sonst gleichen Bedingungen.

2.13 Bestimmung der thermalen Stabilität von Enzym-Proteinen

Um zu untersuchen, ob cDPG und andere niedermolekulare Komponenten eine thermostabilisierende Wirkung auf Enzyme haben, wurden gereinigte Protein-Fractionen unter anaeroben Bedingungen gegen den jeweils adäquaten Puffer dialysiert. Die Inkubationsbedingungen, z.B. Protein- und/oder Soluten-Konzentration, wurden im Anaeroben-Zelt eingestellt, anschließend die Ansätze in Glaskapillaren pipettiert, abgeschmolzen und bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben auf Eis abgekühlt. Eine Kontrolle erfolgte in Abwesenheit niedermolekularer Solute, eine andere unter Zugabe der Solute. Die jeweils nach gleich langer Inkubation bei RT ermittelte Aktivität wurde als maximale Aktivität (= 100 %) verrechnet.

Eingesetzte mesophile Enzyme:

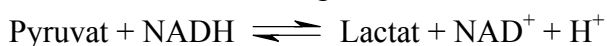
Lactat-Dehydrogenase (LDH, Sigma, L-2500), Triosephosphat-Isomerase (TIM, Sigma, T-2391), Enolase (Eno, Sigma, E-0379), Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH, Sigma, G-0763), Citratsynthase (CS, Sigma, C-3260)

Zur Probenvorbereitung wurden alle Enzyme gegen den beschriebenen Puffer ü. N. dialysiert. Nach der Protein-Quantifizierung wurde die Konzentration der Enzymlösung auf 0,2 mg ml⁻¹ eingestellt; in den Inkubationen wurden Konzentrationen von 50 µg ml⁻¹ eingesetzt. Die Rest-Aktivität der Enzyme wurde mit folgenden Standard-Methoden ermittelt:

1. Inkubation mit LDH (kontinuierlicher Test) dialysiert gegen 50 mM HEPES (pH = 7,0)

Ermittlung der Rest-Aktivität: Assay RT, OD₃₆₆: 892,5 µl Imidazol 0,1 M; pH 6,5; 50 µl NADH (10 mg ml⁻¹); 50 µl Pyruvat (0,1 M); 7,5 µl Probe

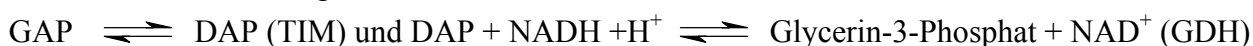
Photometrische Messung der verbliebenen Rest-Aktivität bei RT:



2. Inkubation mit TIM (gekoppelter Test) dialysiert gegen 50 mM HEPES (pH = 7,0)

Ermittlung der Rest-Aktivität: Assay RT, OD₃₆₆: 5 µl Probe; 75 µl GAP (0,1 M); 5 µl NADH (0,2 M); 3 µl GDH; 912 µl 50 mM HEPES, pH = 7,0

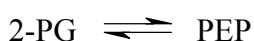
Photometrische Messung der verbliebenen Rest-Aktivität bei RT:



3. Inkubation mit Eno (kontinuierlicher Test) dialysiert gegen 50 mM Tris (pH = 8,1)

Ermittlung der Rest-Aktivität: Assay 37° C, OD₂₄₀: 25 µl Enzymprobe, 20 µl 2-PG (0,1 M); 955 µl Tris 50 mM, 0,1 M KCl, 0,01 mM EDTA (pH = 8,1)

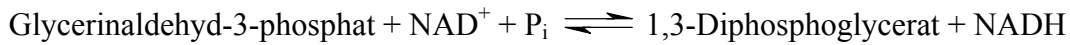
Photometrische Messung der verbliebenen Rest-Aktivität bei 37° C:



4. Inkubation mit GAPDH (kontinuierlicher Test) dialysiert gegen 50 mM HEPES (pH = 7,0)

Ermittlung der Rest-Aktivität: Assay 45° C, OD₃₆₆: 930 µl HEPES pH = 7,0 mit 0,2 M KCl;
10 µl Probe; 30 µl GAP (0,1 M); 30 µl NAD (0,1 M)

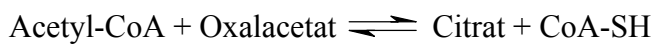
Photometrische Messung der verbliebenen Rest-Aktivität bei 45° C:



5. Inkubation mit CS (gekoppelter Test) dialysiert gegen 100 mM Tris (pH = 7,5)

Ermittlung der Rest-Aktivität: Assay 37° C, OD₄₀₅: 930 µl 0,1 M Tris (pH = 7,5); 40 µl OAA (50 mM); 10 µl AcCoA (20 mM); 10 µl DTNB (5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure), Ellmanns' Reagenz) (10 mM); 10 µl Probe

Photometrische Messung der verbliebenen Rest-Aktivität bei 37° C:



Die freie SH-Gruppe von CoA-SH reagiert mit DTNB zu einem bei 405 nm nachweisbaren Komplex.

2.14 Produktion von Antikörpern

Saubere cDPGS-Fraktionen wurden in einer Konzentration von 370 mg ml⁻¹ zur Gewinnung von Antikörpern eingesetzt. Das Enzym wurde mit 2,5 % SDS versetzt und 1 min bei 94° C denaturiert. Die so behandelte Probe wurde portioniert und bei -20° C eingefroren. Die Antikörper-Produktion wurde von Fa. Eurogentech, Seraing, Belgien durchgeführt; die anti-cDPGS wurde bis zu ihrem Gebrauch portionsweise bei -20° C gelagert.

2.15 Proteinanalytische Methoden

2.15.1 Protein-Bestimmung

Die Bestimmung des Protein-Gehaltes wurde mit Hilfe des "Proteinassay" der Fa. Biorad, München, durchgeführt. Die Bestimmung erfasste Konzentrationen von 1 bis 10 µg Protein (Bradford, 1976). 10 bis 200 µl der zu bestimmenden Enzymlösungen wurden mit dem jeweiligen Lösungspuffer auf 800 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 200 µl des "Proteinassay"-Reagenzes 15 min bei RT inkubiert; Rinderserum-Albumin (BSA) wurde als Standard herangezogen. Abschließend wurde die Extinktion bei 578 nm bestimmt und mit der Extinktion des Standards verrechnet.

2.15.2 Konzentrierung von Protein-Lösungen

2.15.2.1 Molekularsieb-Zentrifugation

Zur Konzentrierung von nativer cDPGS wurden Molekularsieb-Röhrchen Centricon 50 (Amicon, Probenreservoir 2 ml, Ausschlussvolumen 50 kDa) oder Centriprep 50 (Amicon, Probenreservoir 15 ml, Ausschlussvolumen 50 kDa) herangezogen.

2.15.2.2 Acetonfällung

Zur Konzentration von Protein-Lösungen für die SDS-PAGE (s. Punkt 2.15.5) wurde eine Aceton-Fällung durchgeführt. Durch Zugabe von 2 Vol. Aceton und anschließender Inkubation bei -20°C über 30 min wurde das Protein präzipitiert. Danach wurde das Präzipitat durch 30-minütige Zentrifugation bei $20\,000 \times g$ und 4°C sedimentiert, in der Speedvac getrocknet und in 1 x Laemmli-Puffer gelöst.

2.15.3 Bestimmung der molekularen Masse unter nativen Bedingungen

Die Bestimmung der molekularen Masse unter nativen Bedingungen erfolgte bei RT durch Gel-Filtration unter Verwendung der HiLoad 26/60 Superdex 200 prepgrade (Pharmacia, Fluss: $0,75\text{ ml min}^{-1}$, Puffer: 10 mM TES/KOH ($\text{pH} = 7,0$), 300 mM KCl, 7,5 mM DTT). Die verwendeten Eichproteine Ferritin (443 000 Da; 1 mg), Alkohol-Dehydrogenase (148 000 Da; 1,25 mg), D-Lactat-Dehydrogenase (78 000 Da; 0,1 mg), Phosphoglycerat-Kinase (45 000 Da, 0,2 mg) und Cytochrom c (12 500 mg; 2 mg) wurden vor ihrer Verwendung gegen obigen Puffer dialysiert und der zu analysierenden Proteinprobe (Gesamtvol. 10 ml) beigelegt. Anschließend erfolgte der Probenauftrag unter Verwendung des Pharmacia Superloops und die Fraktionen (1,5 ml Vol.) ab der 175. min gesammelt.

Die Enzymaktivitäten bzw. Absorption der Eich-Enzyme wurden bei RT folgendermaßen ermittelt:

Ferritin: photometrisch bei OD_{217}

Alkohol-Dehydrogenase: Aktivitätsbestimmung im optischen Test bei OD_{366}

Testreaktion bei RT: 0,1 M Tris/HCl ($\text{pH} = 7,0$); 0,4 mM NADH;
2 mM Acetaldehyd

D-Lactat-Dehydrogenase: Aktivitätsbestimmung im optischen Test bei OD_{366}

Testreaktion bei RT: 0,1 M Tris/HCl ($\text{pH} = 7,0$); 0,4 mM NADH;
2 mM Pyruvat

Phosphoglycerat-Kinase: Aktivitätsbestimmung im optischen Test bei OD₃₆₆
Testreaktion bei RT: 0,1 M Tris/HCl (pH = 7,0); 0,4 mM NADH;
10 mM Mg²⁺-ATP; 10 mM 3-Phosphoglycerat;
2 U Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)
Cytochrom c: photometrisch bei OD₄₁₆

2.15.4 Bestimmung der molekularen Masse unter denaturierenden Bedingungen

Die Molekularmasse der Untereinheiten von Proteinen wurde mit Hilfe der SDS-PAGE (Punkt 2.15.5) über den Proteinmix-Standard SDS-7 (Sigma) ermittelt. In diesem Marker sind folgende Proteine als Größenstandards enthalten: Rinderserum-Albumin (mol. Masse = 66 000 Da), Ovalbumin (mol. Masse = 45 000 Da), GAPDH aus Kaninchenmuskel (mol. Masse = 36 000 Da), Carboanhydrase aus Rindererythrocyten (mol. Masse = 29 000 Da), Trypsinogen aus Rinderpankreas (mol. Masse = 24 000 Da), Trypsininhibitor aus Sojabohne (mol. Masse = 20 100 Da) sowie α -Lactalbumin aus Rindermilch (mol. Masse = 14 200 Da). Die Auswertung erfolgte über eine Kalibrierkurve, bei der die logarithmierten Molekularmassen der Marker-Proteine gegen ihre relative Mobilität aufgetragen wurden.

2.15.5 Protein-Trennung durch diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli

Zur Protein-Trennung durch diskontinuierliche Gel-Elektrophorese (Glycin-SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) wurden Minigel-Twin-Kammern (Biometra, Göttingen) verwendet. Zunächst wurde ein Trenngel (Endkonzentration: 10-12 % Polyacrylamid; 0,375 M Tris/HCl (pH = 8,8); 0,1 % SDS; 0,03 Vol% APS; 0,005 Vol% TEMED) gegossen und mit 2-Butanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde darauf das Sammelgel (Endkonzentration: 4 % Polyacrylamid; 0,125 M Tris/HCl (pH = 6,8); 0,1 % SDS; 0,03 Vol% APS; 0,005 Vol% TEMED) gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Die Zusammensetzung der Puffer erfolgte nach Laemmli, 1970 (Polyacrylamid-Lösung: 29,2 % Acrylamid, 0,8 % Bis-Acrylamid; Trenngelpuffer: 1,5 M Tris, 0,4 % SDS; Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris, 0,4 % SDS; Laufpuffer: 0,025 M Tris, 0,19 M Glycin, 0,1 % SDS). Die Lösungen für das Trenn- bzw. Sammelgel wurden vor Zugabe des Polymerisationsmittels (TEMED) jeweils sorgfältig entgast. Je nach Protein-Konzentration wurden die Proben entweder vorher mit Aceton gefällt (s. Punkt 2.15.2.2) und mit 20 μ l Probenpuffer (60 mM Tris/HCl (pH = 6,8); 10 % Glycerin; 5 % ME; 2 % SDS; 0,1 % Bromphenolblau) aufgenommen oder direkt mit 5-fach konzentriertem Probenpuffer (15 μ l Probe mit 4 μ l Puffer) versetzt. Anschließend erfolgte eine max. 2-minütige Erhitzung der Proben bei 94 °C. Die SDS-PAGE wurde dann 45 min bei 10 mA und abschließend weitere 2 bis 3,5 Stunden bei 15 mA durchgeführt.

2.15.6 Elektro-Protein-Transfer von Acrylamid-Gelen auf Blot-Membranen

Zur Übertragung von Proteinen aus SDS-PAGE ohne vorherige Färbung auf Trägermaterial wie Nytran oder Nitrocellulose wurde nach bereits beschriebenen Methoden (Eckerskorn *et al.*, 1988; Jungblut *et al.*, 1990) mittels einer CarboGlas Semidry-Transferkammer (Schleicher & Schuell) bei 4° C durchgeführt. Dazu wurden im Anschluss an die Gel-Elektrophorese nach Abtrennung des Sammelgels das Proteingel, die Blot-Membran sowie drei Lagen der als Pufferreservoir dienenden Filterpapiere (Whatman 3MM, Biorad, München) gleicher Größe 30 min in Blotpuffer (25 mM Tris (pH = 8,3), 192 mM Glycin, 4 % Methanol (v/v)) äquilibriert. Der Blotaufbau erfolgte gemäß der Vorschrift des Geräteherstellers von Schleicher & Schuell (Jungblut *et al.*, 1990): Auf der Anode wurden 3 tropfnasse Lagen des Filterpapiers gelegt, darüber die Membran und das Gel positioniert und mit nochmals drei Filterpapierlagen bedeckt. Für einen einwandfreien Transfer ließen sich zwischen den Lagen befindliche Luftblasen mit einem Glasstab durch Ausrollen entfernen. Abschließend wurde auf diesen Aufbau die Kathode gelegt, das System mit einem 2 kg-Gewicht beschwert und der Blot für 2 bis 3 h bei 0,9 mA cm⁻² Gelfläche durchgeführt.

Abhängig von der weiteren Verwendung des Blots erfolgte anschließend eine Färbung mit folgenden Methoden: Zur Kontrolle des Protein-Transfers wurde die Membran eine Minute mit Ponceau "S" (0,2 % Ponceaurot S (w/v), 1 % Essigsäure (v/v)) gefärbt, danach mit A. bidest. entfärbt und luftgetrocknet. Zur Bestimmung von Aminosäure-Sequenzen wurde die Membran eine Minute in 0,1 % Serva Blau R, 40 % Methanol und 10 % Essigsäure gefärbt, in reinem Methanol entfärbt und luftgetrocknet. Für eine spezifische Detektion mit Antikörpern (s. Punkt 2.15.8) wurde die Membran vor dem immunologischen Nachweis lediglich luftgetrocknet; um den Bereich abzuschätzen zu können, in dem interessierendes Protein zu erwarten war, wurde ein vorgefärbter Molekulargewichtsmarker bei dem Elektropherogramm mitgeführt (SeeBlue Prestained Standard, Novex).

2.15.7 Protein-Detektion in Acrylamid-Gelen

2.15.7.1 Coomassie Blue-Färbung

Nach der Gel-Elektrophorese wurde das Gel direkt in Färbelösung überführt (40 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,1 % Serva Blau R) und bei 50° C über 30 min gefärbt. Anschließend wurde in 5 %-igem Methanol und 7,5 %-iger Essigsäure entfärbt (Laemmli, 1970).

2.15.7.2 Silber-Färbung

Zur Analyse geringer Protein-Mengen konnte die Silber-Färbung nach Heukeshoven und Dernick (1985), die noch 20 ng Protein nachzuweisen erlaubt, angewendet werden. Zunächst wurde das Gel fixiert (Lösung 1, 30 min), dann inkubiert (Lösung 2, 30 min) und in A. bidest. gewaschen (3 x 5 min). Anschließend erfolgte die Silber-Färbung (Lösung 3, 40 min) und die Entwicklung (Lösung 4, 15 min). Nach Abbruch dieser Reaktion (Lösung 5, 15 min) und Entfernung der Chemikalien durch Schwenken in A. bidest. (2 x 10 min) konnten die Gele in 10 %-igem Glycerin gelagert werden.

Lösung 1: 100 ml Ethanol; 25 ml Essigsäure; 125 ml A. bidest

Lösung 2: 75 ml Ethanol; 10,25 g Na-Acetat; 1,3 ml Glutaraldehyd; 0,5 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ pro 250 ml

Lösung 3: 50 μl Formaldehyd; 0,25 g AgNO_3 pro 250 ml

Lösung 4: 6,25 ml Natriumcarbonat; 50 μl Formaldehyd pro 250 ml

Lösung 5: 3,65 g EDTA pro 250 ml

2.15.8 Protein-Detektion auf Blot-Membranen durch immunologischen Nachweis

Die im Folgenden beschriebenen Inkubationen wurden bei RT unter leichtem Schwenken durchgeführt. Nach dem Quenchen der Membran (Quenchpuffer, 1 h) wurde sie mit in Quenchpuffer befindlichem cDPGS-Antikörper inkubiert (Verhältnis von Antikörper zu Puffer 1 : 10 000) und zur Entfernung überschüssiger Antikörper-Lösung anschließend gewaschen (Spül-puffer, 3 x 15 min). Nach erneuter Äquilibration der Membran (Quenchpuffer, 10 min) wurde diesem Ansatz ein sekundärer Antikörper beigelegt und inkubiert (Alkalische Phosphatase konj. Anti rabbit IgG (Fc), Promega (1: 7 500), 1 h Inkubation). Nichtgebundene Antikörper-Lösungen wurden entfernt (Spülpuffer, 3 x 10 min) und nacheinander folgende Lösungen zugegeben: 9 ml NaCO_3 -Puffer, 20 μl NBT-Lösung und 100 μl BCIP-Lösung. Die Farbentwicklung wurde beobachtet (ca. 5 bis 30 min) und die Reaktion durch mehrmaliges Spülen mit H_2O abgestoppt. Nach Trocknung an der Luft konnte die Membran bei RT dunkel gelagert werden.

Spülpuffer: 0,9 % (w/v) NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH = 7,4)

Quenchpuffer: Spülpuffer mit 5 % (w/v) Magermilch

Substratlösung: 50 mM NaCO_3 -Puffer (pH = 9,5)

0,1 % (w/v) NBT (0,01 g ml^{-1} in 50/50 H_2O /Dimethylformamid)

50 mg ml^{-1} BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, Boehringer)

2.15.9 Elektrospray-Massenspektrometrie

Zur Ermittlung der molekularen Masse von natürlicher cDPGS aus *Mt. fervidus* und dem rekombinanten Enzym wurden Untersuchungen von 2 Arbeitsgruppen durchgeführt.

Bei Messungen der AG Lottspeich (MPI Martinsried) wurden Fraktionen auf eine online mit einem APIIII-Tandem Quadropol-Detektor (Sciex, Thornhill, Kanada) verbundene Reverse Phase HPLC-Säule (Aquapore RP-300 C8; Flussrate 15 $\mu\text{l min}^{-1}$; Puffer A: 0,1 % Tri-Fluoressigsäure in Wasser; Puffer B: 0,1 % Tri-Fluoressigsäure in Acetonitril; Gradient: 1 % Puffer B min^{-1}) aufgetragen, die mit einer atmosphärischen Druck-Ionisationsquelle gekoppelt war. Das Verhältnis von Ladung zu Masse (m/z) des Instrumentes wurde durch die Ammonium-Addukt-Ionen aus Propylenglycol kalibriert. Die durchschnittliche molekulare Masse der Proteine konnte anhand der Ladungsverteilungsprofile der mehrfach geladenen Ionen aus dem Verhältnis von m/z kalkuliert werden.

Die Untersuchungen der AG Meyer (Ruhr-Universität Bochum) erfolgten unter Verwendung einer online mit einem APEXIII-FTICR Massenspektrometer (Bruker-Daltonics, Fällanden, Schweiz) verbundenen Reverse Phase HPLC-Säule (Michrom Magic C8; Flussrate 5 $\mu\text{l min}^{-1}$; Puffer A: 0,025 % Tri-Fluoressigsäure in Wasser; Puffer B: 0,02 % Tri-Fluoressigsäure in Acetonitril; Gradient: 0,75 % Puffer B min^{-1}). Die Anfangsgeschwindigkeit der Protein-Ionen ist wegen der Vorgänge beim Ionisationsprozess und der Durchleitung durch das Massenspektrometer stets unterschiedlich; dies kann zu Ungenauigkeiten bei der Massen-Auflösung und -Genauigkeit führen. Bei einem FTICR-Massenspektrometer verläuft die Massen-Auflösung über die Zyklotron-Frequenz, die unabhängig von der Ionengeschwindigkeit und umgekehrt proportional zum m/z -Verhältnis ist.

2.15.10 Bestimmung der N-terminalen Aminosäure-Sequenz durch automatisierten Edman-Abbau

Die N-terminale Aminosäure-Sequenz ließ sich nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Blotten der Proteine auf eine Nytran-Membran durch automatisierten Edman-Abbau in einem Gasphasen-Sequenator (Proteinsequenzer 473 A/Applied Biosystems) durchführen. Dazu wurden die entsprechenden Bereiche aus der Membran geschnitten und anschließend dem Edman-Abbau unterzogen. Die Arbeiten zur Sequenzierung der cDPGS aus *Mt. fervidus* und dem Expressionsklon wurden von Herrn Wüster, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 cDPG: Vorkommen, Temperatur-Abhängigkeit der intrazellulären Konzentration, thermoprotektive Wirkung

3.1.1 Vorkommen von cDPG

cDPG wurde zunächst in *Methanothermobacter thermautotrophicus* als auffälliger Bestandteil des intrazellulären Ionen-Milieus gefunden (Seely und Fahrney, 1983; Kanodia und Roberts, 1983). Nachfolgende Untersuchungen (Tolman *et al.*, 1986; Hensel und König, 1988; Lehmacher und Hensel, 1990b; Rudnik *et al.*, 1990; Gorkovenko *et al.*, 1994) wiesen cDPG auch in weiteren methanogenen Archaea nach (*Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanopyrales*). Die höchsten Konzentrationen konnten bislang in dem hyperthermophilen *Mp. kandleri* mit einer Konzentration von 1,1 M bzw. 3,7 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ Prot. festgestellt werden (Kurr *et al.*, 1991; Martins *et al.*, 1997). Die ermittelten Werte konnten in der vorliegenden Arbeit durch IC-Analysen im Wesentlichen bestätigt werden (4,1 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ Prot.). Wie sich bei weiteren Analysen zeigte, ist das Vorkommen von cDPG allerdings nicht auf die methanogenen Archaea beschränkt, sondern tritt auch bei den hyperthermophilen *Pyrococcales* auf. So ließen sich in dem hyperthermophilen, obligat heterotrophen *Pyrococcus woesei* deutliche, wenn auch - im Vergleich zu den Methanogenen - geringe Konzentrationen von cDPG (0,2 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ Prot.) nachweisen. Dagegen scheinen Organismen aus Verwandtschaftskreisen außerhalb der Euryarchaeota nicht zur cDPG-Synthese befähigt zu sein. So ergaben IC-Analysen mit Roh-Extrakten des hyperthermophilen Crenarchaeoten *T. tenax* keine Anhaltspunkte für die Anwesenheit von cDPG in diesem Organismus.

Bemerkenswerterweise können in den Genomen von *Mb. thermautotrophicus* (Basionym: *Methanobacterium thermoautotrophicum*, Wasserfallen *et al.*, 2000) und von dem mit *P. woesei* sehr nah verwandten *P. furiosus* Leserahmen gefunden werden, die hohe Sequenz-Ähnlichkeiten mit den beiden Genen zeigen, die in *Mt. fervidus* die cDPG-synthetisierenden Enzyme 2-PGK (Lehmacher und Hensel, 1994) und cDPGS (Matussek *et al.*, 1998) codieren. Die Identitätswerte der abgeleiteten Protein-Sequenzen betragen für die cDPGS 73 % (*Mb. thermautotrophicus*) und 41 % (*P. furiosus*) bzw. für 2-PGK 71 % (*Mb. thermautotrophicus*) und 42 % (*P. furiosus*). Außerdem scheinen auch *P. horikoshii* und *P. abyssi* homologe Gene zu besitzen, die für cDPGS und 2-PGK codieren. Die Sequenz-Identitäten betragen jeweils 40 % (*P. horikoshii*) und 44 % (*P. abyssi*) für die cDPGS bzw. 42 % (*P. horikoshii*) und 38 % (*P. abyssi*) für die 2-PGK. Ein Protein-Alignment der cDPGS-Homologen von *P. abyssi*, *P. horikoshii*, *P. furiosus*, *Mt. fervidus*, *Mb. thermautotrophicus* und *Mp. kandleri* ist in Abb. 2 dargestellt.

pyrab	SNGKKVFLDNEPVDG--KNLKSAIKKLAERILHDKGG----
pyrho	RSRKRIVFLDYEPKNIDD--KDLRESVKELARRIVNDKGHRKGR
pyrfu	SRGKRIVFLDNEPKNIDG--KDLKEAVINLARRIVNDKGN----
mepka	KAGLGVVYVDNVP [*] IAVGGDYDHVGDAVENVAELAIDRFEG----
mebth	EAGLEVIYCDNIPVVRDGAQDELD [*] DAIISVVERAIADFNLRKTP
metfe	EAGLDVVYCDNIPVVIDESYGN [*] IDD [*] AIIEVVEMAIDDFKNNR--
	* :: * * : :: : :
	420 430 440 450 460

Abb. 2: Aminosäure-Sequenz-Vergleich der cDPGS von *Mt. fervidus* mit cDPGS-Homologen verschiedener euryarchaealer Vertreter. Abkürzungen: pyrab, *Pyrococcus abyssi*; pyrho, *Pyrococcus horikoshii*; pyrfu, *Pyrococcus furiosus*; mepka, *Methanopyrus kandleri*; mebth, *Methanothermobacter thermautotrophicus*; metfe, *Methanothermobacter fervidus*. "*" kennzeichnet in allen Organismen konservierte Aminosäure-Reste; ":" symbolisiert chemisch ähnliche Aminosäure-Reste.

Im Genom des cDPG-negativen *Methanocaldococcus jannaschii* (Basionym: *Methanococcus jannaschii*, Whitman, 2001b) und des bacterialen Vertreters *Deinococcus radiodurans* konnte dagegen nur ein homologes Gen für die 2-PGK (Sequenz-Identität jeweils 43 % bzw. 36 % für die abgeleitete Aminosäure-Sequenz, Abb. 3), nicht jedoch für die cDPGS gefunden werden. Dies deutet darauf hin, dass einerseits der cDPG-Syntheseweg in cDPG-positiven Organismen generell über die beiden Enzyme 2-PGK und cDPGS verläuft, andererseits das Vorliegen der 2-PGK zwar eine notwendige, nicht aber eine hinreichende Voraussetzung für die cDPG-Biosynthese darstellt.

pyrab	-----MIRVVEKGS [*] DVALPFSRGILT
pyrho	-----MIRVIEKGD [*] KVSLPFSRGILT
pyrfu	-----MIKVIERDGK [*] VRLPFSRGILT
mepka	-----MSEKSSRKERDEKTEKETARQ [*] GKHRRIRVKS [*] RHYEMPFSRGVLA
mebth	-----MIMVQGEVSGK [*] KYTEPFSKGVLA
metja	-----MDLQNDIIVRGKSYEMPFSK [*] GILA
deira	RGLQEIGVRELDQIAEHTLAKIYGEHLRLTYRYLQQNRGKLG [*] VISEEDGMPAPFSKGLLV
metfe	-----MILVEGKVAG [*] KKYREPFSKGVLA
	:
	1 10 20
pyrab	RSITSVGIDVDLAYSIAIEVQEELTRKGKSIVTKDEIRKLTYQKLVEKGFKEEAKRYLFW
pyrho	RSITSVGIDVDLAYSIAIEVQEELVKKGKTIVTKDEIRKLTYQKLIEKGFKEEAKRYIFW
pyrfu	RSITSVGVDVLDAYAIATEVQEELIRQGKKVVTKEEIRNITYQKLVEKGFKEEAKRYLFW
mepka	RSLTAIGVEPHKAYEIALKIKEELQDEGIEEISTDELAD-IIRTKLEEIDETLAERYELW
mebth	RSLTRAEMDPNRAYTFASRIE [*] AHLKKNKVDLITIEELVE-IVSEHLRKEDPEVAEKYMLW
metja	RSLTAAGLKPSIAYRIAWDIYEMLK [*] KENIRVIDKADLRRRVYYLISKNYDEVAKKYLLW
deira	QSLLAAGVAPDVARKVARVTQRDLRGSDRLVRRRAQIREKVEALLRDEVGPDVSARYRL
metfe	RSLTRSGMDPTDAYLLAAEVESYLKKEKKKIVTIDELVK-IVYNKLKEKDEKIAEKYIRW
	:*: : * * * : :: : : *
	30 40 50 60 70 80

pyrab	RRFRKMKVPLLLILLGGPTGVGKSTIATELAFRLGIRSVIGTDSIREVLRKVITPELLPTI
pyrho	RRFRKMKVPLIILLGGPTGVGKSTIATELAFRLGIRSVIGTDSIREVLRKIITPELLPTI
pyrfu	RRFRKLKIPLIILLGGPTGVGKSTIATELAFRLGIRSVIGTDTIREVMRKIITPELLPTI
mepka	RRIKKREEPIIVLIGGASGVGTSTIASEVGHRLGITNVIGTDAIREVMRRVLAEELYPTL
mebth	RKIRQCKEPLIILLIGGASGVGTSSIAFEVANRLGIRNMISTDMIREVMRKIVSRELLPSI
metja	RMVLGRR-PIVILIGGASGVGTSTIAFEIASRLGIPSVIGTDSIREVMRKVISRDLIPTL
deira	RVIRTPPRPLIVLLGGVSGTGKSLLAEEIAYRLGISRVASTDSIREVMRAMVSPALLPTL
metfe	RKIREYKEPLILLIAGASGVGTSSIAFEVANRLGIRNMISTDMIREVMRKIMISKELIPSL
	* *::*: *:* * * :* *: **** : ** ****:* :: *:*:
	90 100 110 120 130 140
pyrab	HTSTFLAWKEIKG-----TTSGSPIIAGFESQVS AVAVGVNAIIERAKREGLNAII EG
pyrho	HTSTFLAWKELKG-----TVTDSPIVAGFESQVS AVTVGINAIIERAVREGLNAII EG
pyrfu	HTSTFLAWKELRG-----TVTGSPIIAGFESQVNAVAVGVNAVIQRAIKEGLNAII EG
mepka	YESSYTAWKRLRY-----EPAEDPVITGFLDHSEP VVVGIEGVNRSINEGIHVIVEG
mebth	YESSYTAYQSLRIP-----PPPELDEV LIGFRDHVESVSIGVEAVIERALTEGISIVIEG
metja	YESSYTAWKVLRD-----DEGNK-YIKGFERHSEAVLTGVEGVIDRCLVEGQSVII EG
deira	HASTFNAWEALVPPGQTRPAHPTREELLAGFRDQVQVSVGLS AVVRRSIQEGTSLVLEG
metfe	HESTFTAYKSLRTP-----APVEFDEV LVGFRDHVNVTVGIEAVIERALTEGISIVIEG
	: *:: *:: : : ** : * *: :: * ** :::*
	150 160 170 180 190 200
pyrab	IHVVPGFVD---VKGEMTFMYMIVARSREDLEARFYERTRY--KRSANYIISHLDEIME
pyrho	IHVVPGFVK---VEGEMTFMYMLIARSREDLEARFYERTRY--KRPADYIISHLDEILE
pyrfu	IHLVPGFIK---IDYEMAFMYMIVARSREELEARFYERTRY--KRSQYIISHLDEIME
mepka	VHIVPRLIKKEILNYPNVFVFM LAVEDEEAHKWRFYARSRDTKLSRPAERYLK YFEEIRR
mebth	VHIVPGFIREDLVNKENVAMFVLTVSDENVHKGRFYSRCRQMWARRPLKRYISYFWAIRR
metja	THLVPTLLKDKYLENSHVVFIMLT IYNEELHKMRFYARGRVS--SRPTERYLK YFKIIRM
deira	VHLVPGYIEPAAFQGALLVPMLVGLPDEEEHRRHFESRDTETAASRPLHRYMRYFEEIRT
metfe	AHLVPGFIREELINKNNVAMFVLTVPDEKMHRSR FYSRCRQKWARRPLERYLK YFWAIRR
	: : :: : : * * * *: :: *
	210 220 230 240 250 260
pyrab	IQRYLIERARKFGVPVIENIELEKTIRA IMEDIMERTIEAMKKKGLDMLE--EPK-----
pyrho	IQDYLIRRAKKFNVPVIENVELEETVSKIMEDIMQKTIEIMKKGGLDLLE--EP-----
pyrfu	IQEYLIKKAREYRPVPIIENVELEKTISTIMEDIMEKTVEIMKKKGLDMLE--EPK-----
mepka	IHDFLVEDAEEDIPVINNEHIDETVDQIVSYISSKL-----LKGERE--LSKSVSWW-
mebth	IHRYIENQARKHGVPVIENIDVVT TIDSIIKSLTKTTVKGG-EKGAEKTE-----
metja	INDYMVETAKKKGIPVVENIKISETVDKCLNIITERLKTMI ELEG LSEEDMLEEGL----
deira	MQDELKRLARQYDVPMLDSETLDESADRAVELVLRQVMVALTPEERE AALGEEMAAQLLS
metfe	IHDYIEMQARKHNIP IENIDVVT TIDSIVKSLTEDLVHK--DVGKYKG-----
	:: : * : :*::: : : : :
	270 280 290 300 310 320

Abb. 3: Aminosäure-Sequenz-Vergleich der 2-PGK von *Mt. fervidus* mit 2-PGK-Homologen verschiedener euryarchaealer und einem bacterialen Vertreter.

Abkürzungen: pyrab, *Pyrococcus abyssi*; pyrho, *Pyrococcus horikoshii*; pyrfu, *Pyrococcus furiosus*; mepka, *Methanopyrus kandleri*; mebth, *Methanothermobacter thermautotrophicus*; metja, *Methanocaldococcus jannaschii*; deira, *Deinococcus radiodurans*; metfe, *Methanothermus fervidus*. "*" kennzeichnet in allen Organismen konservierte Aminosäure-Reste; ":" symbolisiert chemisch ähnliche Aminosäure-Reste.

Tab. 3: Aminosäure-Identitäten [%] der cDPGS und 2-PGK von *Mt. fervidus* mit Enzym-Homologen diverser Prokaryonten. Abkürzungen der Organismen s. auch Abb. 2 und 3.

	Archaea						Bacteria
	pyrab <i>P. abyssi</i>	pyrho <i>P. horikoshii</i>	pyrfu <i>P. furiosus</i>	mebth <i>Mb. thermaut.</i>	mpka <i>Mp. kandleri</i>	metja <i>Mt. jannasch.</i>	deira <i>D. radiodurans</i>
cDPGS	44	40	41	73	57	÷	÷
2-PGK	38	42	42	71	47	44	36

Unter Verwendung eines Antiserums gegen die rekombinante cDPGS von *Mt. fervidus* (vgl. Punkt 2.15.8) wurde über Western Blot-Analysen versucht, Enzymhomologe in *Mp. kandleri*, *P. woesei*, *Mo. igneus* und *T. tenax* zu detektieren. Dazu wurden zunächst Roh-Extrakte der verschiedenen Organismen gelelektrophoretisch aufgetrennt, die Proteine durch Elektro-Transfer auf Nitrocellulose-Membranen gebロットet und anschließend einer Immuno-Detektion mit anti-cDPGS unterzogen.

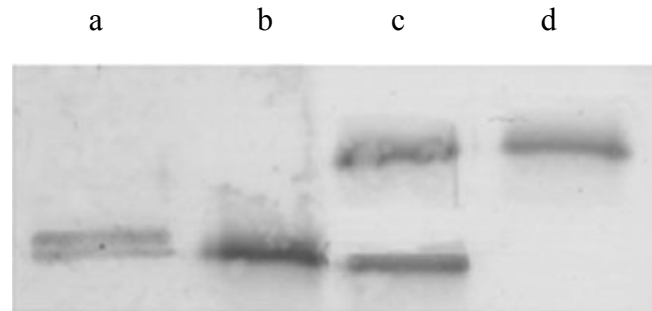


Abb. 4: Western Blot-Analyse von Roh-Extrakten aus *Mt. fervidus*, *Mp. kandleri* und *P. woesei* nach Reaktion mit Anti-Serum gegen rekombinante cDPGS von *Mt. fervidus*. a: *Mt. fervidus* (6 h nach Temperatur-Erhöhung von 83° C auf 93° C in der logarithmischen Wachstumsphase); b: rek. cDPGS von *Mt. fervidus*; c: *Mp. kandleri*; d: *P. woesei*.

Die positiven Signale im Fall von *Mp. kandleri* und *P. woesei* (Abb. 4) bestätigen die Annahme, dass Homologe der *Mt. fervidus*-cDPGS für die Synthese von cDPG in diesen Organismen verantwortlich sind. Wie erwartet, ergaben die Roh-Extrakte von *T. tenax* und *Mo. igneus*, in denen kein cDPG nachgewiesen werden konnte, keine positive Reaktion. Bei einem Protein Blast Search nach Eingabe der aus 460 Aminosäuren bestehenden cDPGS-Sequenz aus *Mt. fervidus* (Matussek, 1996) wurden Homologe ermittelt, die eine ähnliche Größe wie dieses Enzym aufweisen (*Mp. kandleri*: 456 Aminosäuren; *P. woesei*: 431 Aminosäuren). Unter der Annahme, dass die nach Einsatz des *Mt. fervidus*-cDPGS-Antikörpers in Abb. 4 dargestellten Signale durch diese Proteine erzeugt werden, könnte die deutlich geringere Laufstrecke des Signal gebundenen Proteins von *P. woesei* sowie der oberen im Roh-Extrakt von *Mp. kandleri* auftretenden Bande auf Modifikationen der entsprechenden Protein-Species hindeuten.

3.1.2 Temperatur-Abhängigkeit der intrazellulären cDPG-Konzentration in *Mt. fervidus*

Der Temperatur-Einfluss auf die intrazelluläre cDPG-Konzentration in *Mt. fervidus* und anderen Methanogenen wurde bereits von unserer Arbeitsgruppe (Hensel und König, 1988; Lehmacher und Hensel, 1990b; Ruepp, 1992) untersucht. Die Untersuchungen beruhten auf einem Vergleich der intrazellulären Konzentrationen von Kulturen, die bei bestimmten Temperaturen gezogen wurden. Diese Versuche zeigten bei den hyperthermophilen Vertretern der Methanogenen eine positive Korrelation zwischen Temperatur und intrazellulärer cDPG-Konzentration. Eine Erhöhung der Wachstumstemperatur führte zu einer Zunahme des Gehaltes der niedermolekularen Komponente. Außerdem konnte bei Vergleichen der intrazellulären Konzentrationen verschiedener thermophiler Arten gezeigt werden, dass der Gehalt an cDPG mit der Höhe der jeweils optimalen Temperatur zunimmt. Die cDPG-Konzentrationen von *Mt. fervidus* (optimale Wachstumstemp.: 83° C) liegen bei 300 mM (Hensel und König, 1988), die von *Mt. sociabilis* (optimale Wachstumstemp.: 88° C) bei 320 mM und die von *Mp. kandleri* (optimale Wachstumstemp.: 100° C) bei 600 mM (Lehmacher und Hensel, 1990b). Eine Ausnahme in dieser Reihe bildet der moderat thermophile *Mb. thermautotrophicus* (optimale Wachstumstemp.: 64° C), dessen intrazelluläre cDPG-Konzentration von 65 mM sogar um 25 mM niedriger liegt als die des mesophilen *Methanobacterium bryantii* (optimale Wachstumstemp.: 37° C).

Im Unterschied zu den vorangegangenen Untersuchungen sollte in dieser Arbeit die Geschwindigkeit der Konzentrationsänderung durch Temperatur-Umstellungsversuche erfasst werden, um hieraus Rückschlüsse für den Mechanismus der Konzentrationsanpassung ziehen zu können. Hierzu wurde *Mt. fervidus* in einem 100 l-Fermenter bei 83° C bis zur mittleren exponentiellen Phase angezogen und anschließend bei 93° C (Temperatur-Erhöhung, Zelldichte $8,7 \times 10^7$) bzw. bei 68° C (Temperatur-Erniedrigung, Zelldichte $9,4 \times 10^7$) über 24 h weiter kultiviert. In weiteren Ansätzen wurden analoge Temperatur-Änderungen in der stationären Phase (Zelldichten: $3,2 \times 10^8$ bei Temperatur-Erhöhung, $3,5 \times 10^8$ bei Temperatur-Erniedrigung) durchgeführt. Eine Kontrollkultur wurde jeweils bei const. 83° C gezogen.

Im Anschluß an die genannten Temperatur-Änderungen von 83° C auf 93° C bzw. 68° C wurde die intrazelluläre cDPG-Konzentration nach 3, 6, 9 und 24 Stunden ermittelt. Wie in Abb. 5 zu erkennen, ist die cDPG-Konzentrationsanpassung bei Zellen nach Umstellung in der frühen log. Phase sowohl bei der Temperatur-Erhöhung (Anstieg der cDPG-Konzentration von 1,23 auf 1,59 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ Prot.) als auch bei der Temperatur-Erniedrigung (Abfall der cDPG-Konzentration von 1,25 auf 0,93 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ Prot.) nach 9 h weitgehend abgeschlossen, was einer Generationszeit von *Mt. fervidus* in der log. Wachstumsphase entspricht. Ähnliche Ergebnisse zeigten Untersuchungen mit Zellen, bei denen die Temperatur-Änderungen in der stationären Phase durchgeführt wurden (Abb. 6). Sowohl bei Temperatur-Erhöhung (Anstieg der cDPG-Konzentration von 1,29 auf 1,64 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ Prot.) als auch bei Temperatur-Erniedrigung (Abfall

der cDPG-Konzentration von 1,26 auf 0,94 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ Prot.) sind die Anpassungen der cDPG-Konzentration an die neuen Temperatur-Bedingungen nach ungefähr 9 h vollzogen.

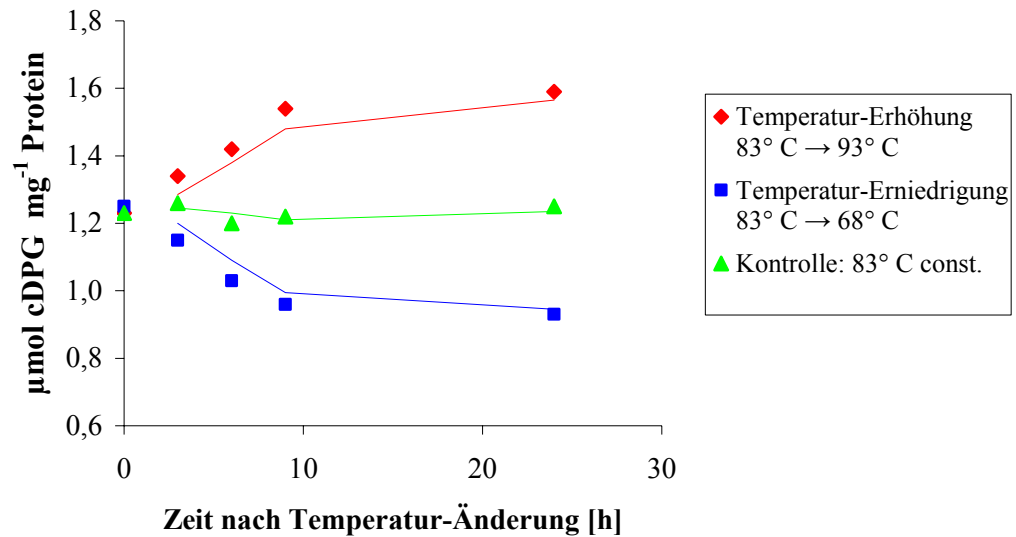


Abb. 5: cDPG-Konzentrationsanpassung in *Mt. fervidus* nach einer Temperatur-Veränderung von 83° C auf 93° C bzw. 68° C in der frühen logarithmischen Wachstumsphase.

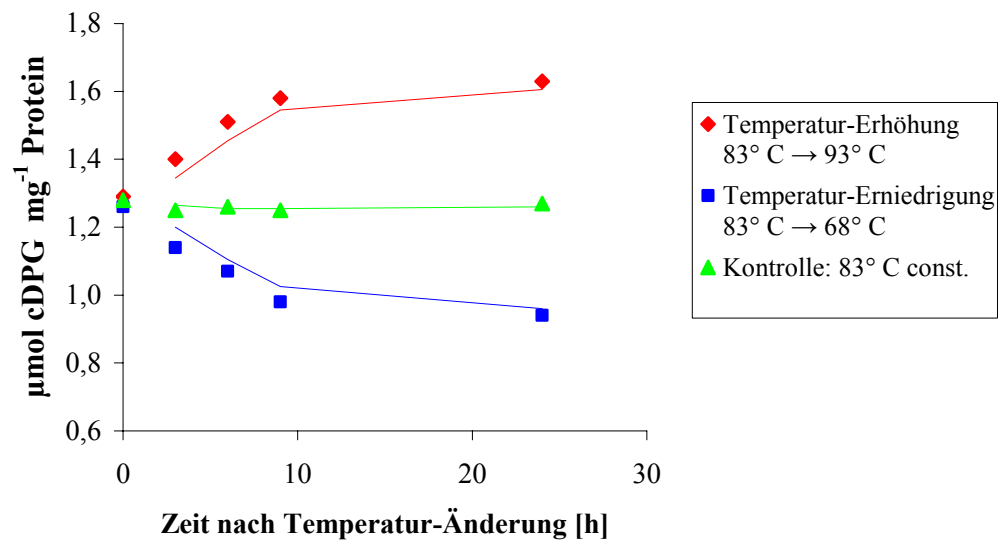


Abb. 6: cDPG-Konzentrationsanpassung in *Mt. fervidus* nach einer Temperatur-Veränderung von 83° C auf 93° C bzw. 68° C in der stationären Wachstumsphase.

3.1.3 Stabilisierende Wirkung von cDPG auf Enzyme von hyperthermophilen und mesophilen Organismen

In vorangegangenen Untersuchungen (Lehmacher und Hensel, 1990b) konnte gezeigt werden, dass das K-Salz von cDPG Enzym-Proteine von *Mt. fervidus* gegenüber Thermo-Inaktivierung schützt; die protektive Wirkung ist mit der von Kalium-Phosphat vergleichbar.

Um abzuklären inwieweit cDPG auch auf Proteine aus anderen Organismen, die cDPG nicht oder nur in geringeren Konzentrationen enthalten, stabilisierend wirkt, wurden Hitze-Inaktivierungsuntersuchungen mit NADP⁺-abhängiger Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und Triosephosphat-Isomerase (TIM) aus *P. woesei* (intrazelluläre cDPG-Konz.: 0,2 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ Prot.) bzw. mit nichtphosphorylierender Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase (GAPN) und GAPDH aus *T. tenax* (cDPG-negativ) durchgeführt (Abb. 7). Die Versuche zeigten, dass cDPG generell als Thermo-Stabilisator wirkt. Im Fall der *P. woesei*-Enzyme ist die stabilisierende Wirkung von cDPG sogar höher als die von DIP, das in diesem Organismus - neben Mannosylglycerat (Martins und Santos, 1995) - die Haupt-Komponente des intrazellulären ionischen Milieus dieses Organismus darstellt. Auch bei *T. tenax*, einem Organismus, der autotroph oder heterotroph bei 86° C optimal wächst, seinerseits aber keine auffällig hohe intrazelluläre Ionen-Konzentration aufweist, eignet sich cDPG als Thermo-Stabilisator.

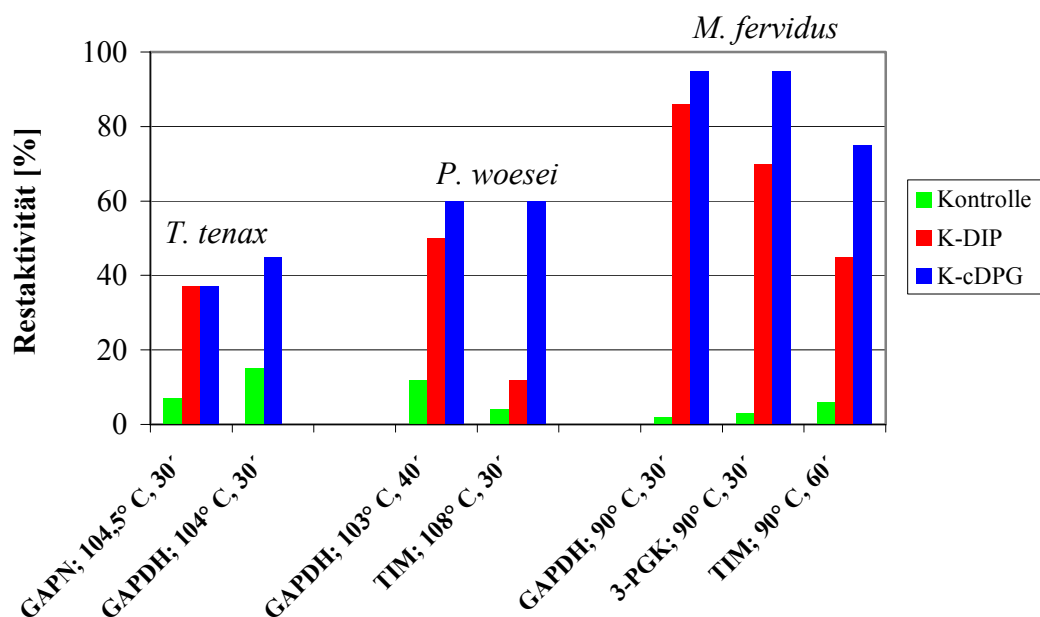


Abb. 7: Thermo-Stabilisierung verschiedener Enzyme aus *T. tenax*, *P. woesei* und *Mt. fervidus* durch K-Salze von cDPG oder DIP. Puffer: 10 mM HEPES (pH = 7,3), 30 mM β -Mercapto-Ethanol; anaerob; Additiv 300 mM, Kontrolle ohne Additiv; Inkubationstemperatur und -Dauer s. obige Abb.

Dagegen scheint die thermostabilisierende Wirkung von cDPG auf Enzyme von mesophilen Organismen eher eingeschränkt zu sein und stark von den jeweiligen Inkubationsbedingungen abzuhängen. Dazu wurde die Wirkung von cDPG und DIP mit den mesophilen Enzymen

Enolase (Eno), Lactat Dehydrogenase (LDH), TIM, GAPDH und Citratsynthase (CS) (s. Punkt 2.13) untersucht. Zur Kontrolle der Messungen wurden stets Inkubationen der Enzyme ohne Zugabe eines niedermolekularen Soluts durchgeführt und die verbliebene Rest-Aktivität bestimmt. Positive Effekte in Gegenwart von cDPG ließen sich lediglich bei GAPDH und CS feststellen.

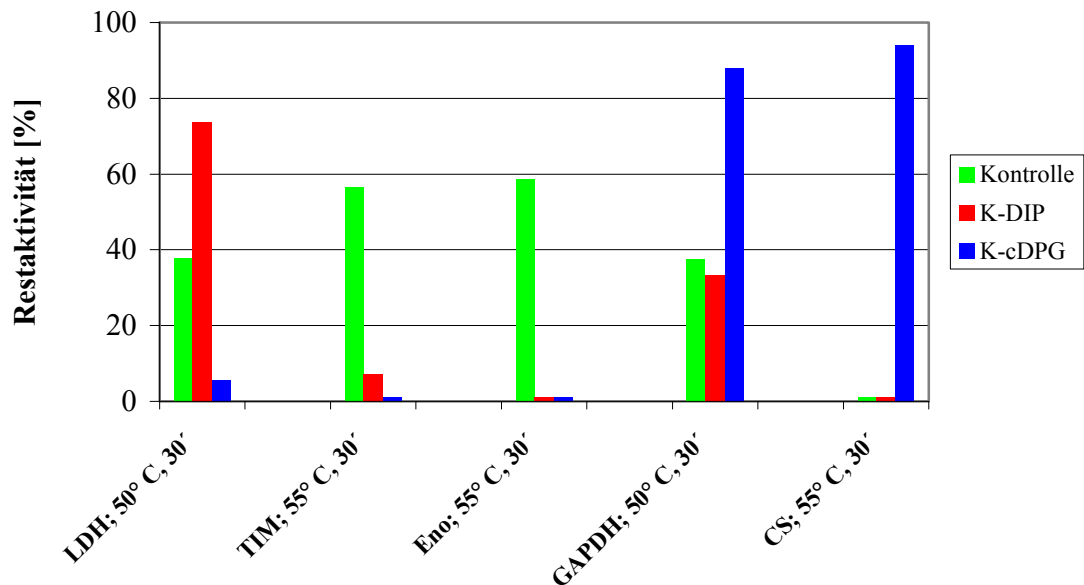


Abb. 8: Einfluss von K-Salzen des cDPG oder DIP auf verschiedene mesophile Enzyme unter Temperatur-Stress. Puffer: LDH, TIM und GAPDH in 50 mM HEPES (pH = 7,0); Enolase in 50 mM Tris (pH = 8,1); Citratsynthase in 100 M Tris (pH = 7,5). Additiv 375 mM, Kontrolle ohne Additiv; Enzyme aus Kaninchen-Muskel, außer Citratsynthase: Schweineherz; Inkubations-Temperatur und -Dauer s. obige Abb.

Bei der CS aus Schweineherz-Muskel lag die Rest-Aktivität nach 30-minütiger Inkubation bei 55° C bzw. 65° C jeweils deutlich über 90 % (Kontrolle: 0 %). Mesophile Enolase wurde in Gegenwart von cDPG und DIP destabilisiert. Bei mesophiler LDH und TIM wirkte cDPG ebenfalls destabilisierend, während sich durch den Einsatz von DIP ein positiver Effekt erzielen ließ (s. Abb. 8). Mesophile GAPDH aus Kaninchen-Muskel zeigte nach 30-minütiger Inkubation bei 50° C in Gegenwart von 375 mM cDPG unter den beschriebenen Bedingungen eine Rest-Aktivität von 88 % (Kontrolle: 37,5 %). Die Stabilisierung durch cDPG steht zunächst im Gegensatz zu vorherigen Untersuchungen, bei denen kein positiver Einfluss des Soluts auf dieses Enzym festgestellt werden konnte (Hensel und König, 1988). Daher wurden Wiederholungsversuche unter identischen Bedingungen mit Kaninchen-Muskel-GAPDH in Gegenwart von 375 mM cDPG durchgeführt: Während in einem aus 10 mM KPO₄ und 15 mM β -Mercapto-Ethanol (pH = 7,0) zusammengesetzten Puffer nach 20-minütiger Inkubation bei 50° C keine Stabilisierung des Enzymes durch cDPG festgestellt werden konnte (analog zu den Ergebnissen von Hensel und König, 1988), zeigte cDPG in einem aus 50 mM HEPES (pH = 7,0) bestehenden Puffer deutlich stabilisierende Effekte (Rest-Aktivität: 90 %, Abb. 8). Offenbar wird die

Wirkung der niedermolekularen Substanz zumindest auf dieses Enzym von der Wahl des Puffersystems stark beeinflusst.

3.2 Charakterisierung der cDPG-Synthetase (cDPGS) aus *Mt. fervidus*-Zellen, die bei optimaler Wachstumstemperatur gezogen wurden

3.2.1 Makromolekulare Eigenschaften

In bisherigen Untersuchungen mit cDPGS aus *Mt. fervidus* stellte sich eine hohe und mit fortschreitender Anreicherung zunehmende Oxidationsempfindlichkeit des Enzymes heraus. Außerdem ergaben sich zunächst Schwierigkeiten bei der eindeutigen Identifikation des Proteins (Lehmacher *et al.*, 1990a), später bei der Bewertung der gelelektrophoretischen Auswertung des Enzymes, welches stets als Doppelbande im Elektropherogramm auftrat (Matussek, 1996). Um möglichen Oxidationsartefakten, die einer Charakterisierung des nativen Enzymes im Weg stehen könnten, vorzubeugen, wurde die chromatographische Aufreinigung unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Die eingesetzten Chromatographie-Materialien orientierten sich weitgehend am Aufreinigungsprotokoll, das von Matussek (1996) erarbeitet wurde. Die zum Aufschluss verwendete French Press Zelle und die benötigten Zentrifugationsröhrchen wurden mit N₂ gespült. Die erste und die zweite Säulen-Chromatographie über Phenylsepharose bzw. Hydroxylapatit wurden ebenso in der Anaeroben-Kammer durchgeführt wie die dazwischen liegenden Dialyse-Schritte. Einzige Ausnahme war der letzte Chromatographie-Schritt über Reactive Green 19, der unter aeroben Bedingungen bei einer Temperatur von 4° C, allerdings in Gegenwart von 7,5 mM DTT stattfand. Anschließend wurden die homogenen cDPGS-Fractionen bis zu ihrer Verwendung anaerob und kühl gelagert. Nach säulen-chromatographischer Aufreinigung über Phenylsepharose, Hydroxylapatit und Reactive Green 19 (Tab. 4) erscheint die cDPG-Synthetase (cDPGS) aus *Mt. fervidus*-Kulturen, die bei der optimalen Wachstumstemperatur von 83° C gezogen wurden, nach Auftrennung im SDS-Gel als Doppelbande mit augenscheinlich gleich starker Ausprägung beider Banden; das aus den Laufstrecken abgeleitete Untereinheiten-Molekulargewicht lag bei 57 000 und 59 000 (s. Abb. 9), welches von dem berechneten Molekulargewicht von 50 657 um 12 bzw. 16 % abwich.

Tab. 4: Reinigung der cDPGS aus *Mt. fervidus*.

Reinigungsschritt	Protein gesamt [mg]	Aktivität gesamt [U]	Aktivität spezifisch [U mg ⁻¹ Protein]	Reinigung x-fach	Ausbeute %
Roh-Extrakt	580,0	10,0	0,02	÷	100
Phenylsepharose	18,0	12,3	0,7	40	120
Hydroxylapatit	0,75	3,1	3,4	200	31
Reactive Green 19	0,07	2,0	29,0	1 430	20

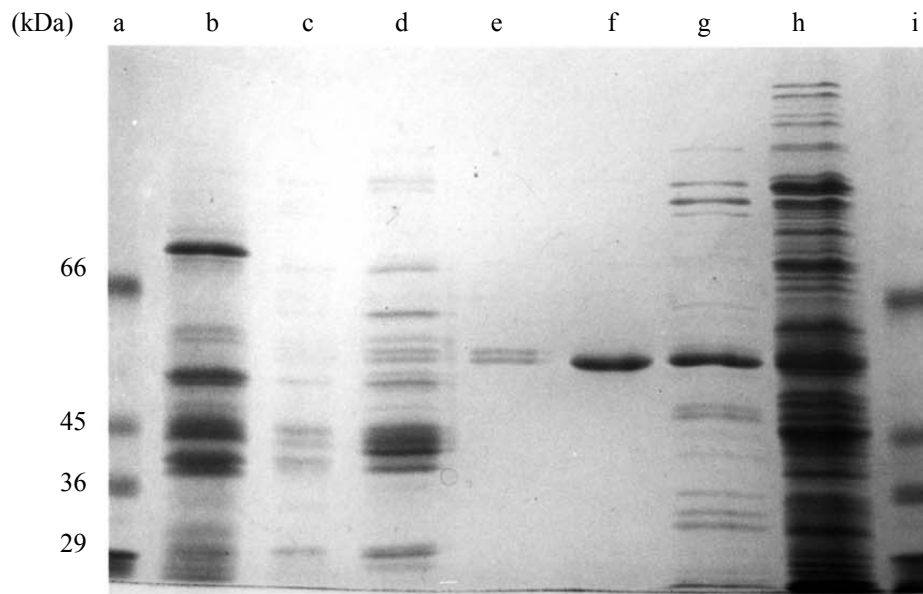


Abb. 9: Elektropherogramm einer SDS-PAGE mit Reinigungsfractionen der cDPGS aus *Mt. fervidus* und rcDPGS aus *E. coli*. b-e: *Mt. fervidus*; f-h: *E. coli* Mfe-cDPGS-MAP-pjf; a: SDS-7 Marker; b: Roh-Extrakt; c: Hydroxylapatit; d: Phenylsepharose; e: Reactive Green 19 Agarose; f: Reactive Green 19 Agarose; g: Hydroxylapatit; h: Roh-Extrakt; i: SDS-7 Marker.

Beide Protein-Banden wurden nach Blotten auf eine Nitrocellulose-Membran N-terminal ansequenziert (s. Punkt 2.15.10). In beiden Fällen ergab sich über 20 Positionen die gleiche Aminosäure-Sequenz:

1	5	10	15	20
G	E	T	K	K
M	I	X	L	V
D	G	E	H	Y
F	P	V	V	K

Bei der Sequenzierung wurden nach dem ersten Abbauschritt der beiden Banden nahezu äquivalente Mengen von PTH-Gly für beide Banden ermittelt (11,7 bzw. 11,4 pmol). Dies bestätigte den visuellen Eindruck eines stöchiometrischen Verhältnisses der beiden Banden von 1:1. Die identische N-terminale Aminosäure-Sequenz beider Protein-Banden deutet darauf hin, dass es sich bei den beiden Protein-Species um Konformere oder kovalent modifizierte Isoformen des gleichen Proteins handelt.

Das unter nativen Bedingungen (Gelfiltration) ermittelte MW der cDPGS beträgt 112 000 (Abb. 10). Das native Protein stellt damit wohl ein Dimer dar. Nicht beantwortet werden kann allerdings die Frage, ob die Enzympräparation aus *Mt. fervidus* aus heteromeren Dimeren besteht oder eine Mischung von zwei verschiedenen homomeren Dimeren darstellt.

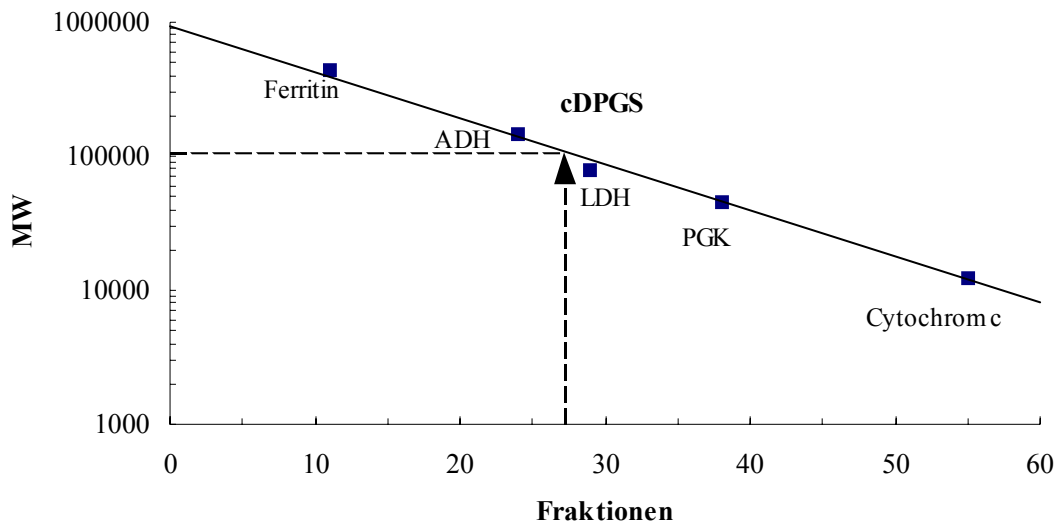


Abb. 10: Bestimmung des Molekulargewichtes der cDPGS aus *Mt. fervidus* unter nativen Bedingungen über HighLoad Superdex. MW der Referenz-Proteine: Ferritin aus Pferdemuskel: 443 000; ADH (Alkohol-Dehydrogenase) aus *Saccharomyces cerevisiae*: 148 000; LDH (D-Lactat-Dehydrogenase) aus *Leuconostoc mesenteroides*: 78 000; PGK (Phosphoglycerat-Kinase) aus *S. cerevisiae*: 45 000 und Cytochrom c (aus Rinderherz): 12 500. Die Fraktion mit der maximalen cDPGS-Aktivität und das aus dem Elutionsverhalten abgeleitete Molekulargewicht ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

3.2.2 Kinetische Eigenschaften

Die Untersuchung der kinetischen Eigenschaften der cDPGS aus Zellen von *Mt. fervidus*, die bei optimalen Wachstumstemperaturen (83° C) wuchsen, wurde in cDPG-Synthese-Richtung und in cDPG-Hydrolyse-Richtung durchgeführt. Die entsprechenden V_{\max} - und K_M -Werte für die Vor- und Rückreaktion sind in Tab. 5 zusammengestellt. Die Daten lassen eine deutliche Bevorzugung der cDPG-Synthese gegenüber der cDPG-Hydrolyse erkennen.

Tab. 5: Kinetische Eigenschaften der cDPGS aus *Mt. fervidus*-Kulturen, die bei einer Anzucht-Temperatur von 83° C gezogen wurden.^a

Reaktion	variables Substrat	K_M (mM)	V_{\max} (U mg ⁻¹)
cDPG-Synthese ^b	ATP	3,0 ± 1,5	32,0 ± 2,0
	DPG	5,8 ± 2,0	32,8 ± 4,0
cDPG-Hydrolyse ^c	ADP	4,7 ± 1,5	4,1 ± 0,8
	cDPG	41,2 ± 4,0	3,8 ± 0,2

^aAssay Bedingungen: 10 mM TES/KOH (pH = 7,0); 875 mM KCl; 5 mM DTT; 83° C (n = 5-7)

^bKonzentration der invariablen Substrate: 40 mM DPG und 15 mM ATP

^cKonzentration der invariablen Substrate: 100 mM cDPG; 17 mM ADP; 50 mM P_i

3.3 Expression und Charakterisierung der rekombinanten cDPGS

3.3.1 Expression der *Mt. fervidus* cDPGS in *E. coli*

Bei Sequenz-Analysen des von Matussek (1996) klonierten cDPGS-Gens in den Expressionsvektor pJF118EH in *E. coli* DH5 α wurden drei Mutationen festgestellt, was eine erneute Klonierung erforderlich machte.

Durch PCR-Mutagenese wurden zwei neue Restriktionsschnittstellen (*Mun*I und *Bam*HI) in das *cpgS*-Gen eingeführt.

Zur Expression des *cpgS*-Gens in *E. coli* BL21(DE3) wurden durch PCR-Mutagenese zwei neue Restriktionsschnittstellen in die flankierenden Regionen des Gens eingeführt. Nach dem Verdau des PCR-Produktes mit den jeweiligen Restriktionsenzymen wurde das Fragment in den geschnittenen Expressionsvektor pJF118EH inseriert. Die Gen-Sequenz wurde auf beiden Strängen überprüft. Allerdings ergab eine N-terminale Sequenzierung (s. Punkt 2.15.10) des rekombinanten Proteins, dass die Abspaltung des N-terminalen Methionylrestes nur teilweise erfolgte. Daher wurde das Methionin-Aminopeptidase (*map*)-Gen aus *E. coli* (Ben-Bassat *et al.*, 1987) direkt hinter das *cpgS*-Gen unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *Mun*I und *Bam*HI eingefügt, nachdem durch PCR-Mutagenese (s. Punkt 2.6.10.2) entsprechende Restriktionsschnittstellen in das *map*-Gen eingefügt wurden. Die gentechnischen Arbeiten wurden freundlicherweise von N. Brunner durchgeführt. Durch nochmalige Protein-Sequenzierung der rcDPGS konnte gezeigt werden, dass die Abspaltung des Initiations-Methionylrestes der rcDPGS durch Co-Expression des *map*-Genes vollständig erfolgte. Die spezifische Aktivität der cDPGS des hitzegefällten Roh-Extraktes lag um Faktor drei höher verglichen zur unvollständig prozessierten Form. Für weitere enzymatische Tests, Antikörper-Produktion und cDPG-Synthese wurde dieser Klon herangezogen (Bezeichnung: "Mfe-cDPGS-MAP-pjf") (s. Abb. 9). Um die kinetischen Eigenschaften der rcDPGS mit denen des (nativen) Enzymes aus *Mt. fervidus* vergleichen zu können, erfolgte die vorherige Aufreinigung des Enzymes aus *E. coli* ebenso unter weitgehender Einhaltung anaerober Bedingungen (incl. der Dialyse-Schritte) über drei säulenchromatographische Schritte (Phenylsepharose, Hydroxylapatit und Reactive Green 19, s. Punkt 2.10 und Tabelle 6). Diese Enzympräparationen wurden bis zu ihrem Einsatz ebenso wie das Pendant aus *Mt. fervidus* anaerob und kühl gelagert. Für cDPGS-Präparationen, die zur cDPG-Produktion und zur Antikörper-Produktion dienten, wurde eine Schnellaufreinigungs-Methode angewandt, die eine Hitzefällung des Roh-Extraktes (30 min bei 75° C) und nach anschließender Zentrifugation (30 min, 38 000 x g) eine Säulen-Chromatographie unter Verwendung von Reactive Green 19 umfasste. Die Chromatographie wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie für die Aufreinigung ohne Hitzefällung beschrieben (s. Punkt 2.10.2). Mit diesem verkürzten Aufreinigungsprotokoll ließ sich die Ausbeute um den Faktor drei steigern.

Tab. 6: Reinigung der cDPGS aus *E. coli*.

Reinigungsschritt	Protein gesamt [mg]	Aktivität gesamt [U]	Aktivität spezifisch [U mg ⁻¹ Protein]	Reinigung x-fach	Ausbeute %
Roh-Extrakt	470,0	80,0	0,15	÷	100
Phenylsepharose	13,1	77,7	5,9	39	96
Hydroxylapatit	2,6	25,3	9,6	64	31
Reactive Green 19	0,9	14,4	15,6	104	18

Häufig werden Fremdgene in *E. coli* nur sehr schlecht exprimiert. Die Ursache dafür liegt häufig im unterschiedlichen Codon-Gebrauch von heterologem Gen und von Genen der Wirtszelle. So kann ein erhöhter Anteil von bestimmten Codons im Fremdgen, für die in *E. coli* nur eine geringe Anzahl von tRNS vorliegt, zur Verzögerung der Translation führen: Bedingt durch die Limitation der benötigten tRNS kommt es zu verkürzten Translationsprodukten und zu einer erhöhten Abbaurate der Transkripte (Kleber-Janke und Becker, 2000; Talarico *et al.*, 2001). Bei einem Vergleich des Codon-Gebrauches von *E. coli* mit den im *cpgS*-Gen von *Mt. fervidus* vorkommenden Codons fällt auf, dass die in *E. coli* seltenen Arginin-Codons AGA und AGG im *cpgS*-Gen häufig auftreten (AGA und AGG codieren 7 bzw. 4 von 18 Argininen, insgesamt somit 61 %); Entsprechendes gilt für das Isoleucin-Codon ATA (ATA codiert 23 von 42 Isoleucinen, also 55 %). Mit der Absicht, die Expression des *cpgS*-Gens zu steigern, wurde das rekombinante Plasmid pJF118EH in den Expressionsstamm *E. coli* BL21-CodonPlus[®](DE3)-RIL (Stratagene) transformiert. Dieser Stamm enthält das sog. "RIL"-Plasmid mit zusätzlichen Kopien der *argU*-, *ileY*- und *leuW*-tRNS-Gene. Die dadurch codierten tRNSs erkennen die Codons AGA/AGG (Arginin), AUA (Isoleucin) und CUA (Leucin). Die gentechnischen Arbeiten wurden freundlicherweise von B. Tjaden durchgeführt. Wie aus Abb. 11 zu ersehen, welche die cDPGS-Expression mit und ohne zusätzlichem RIL-Plasmid dokumentiert, wird durch die Co-Expression des RIL-Plasmides die Menge rekombinanter cDPGS verglichen zum RIL-freien Klon bei gleichzeitiger Abnahme des Anteils an *E. coli*-spezifischen Proteinen deutlich erhöht. Dieser Klon erhielt die Bezeichnung "Mfe-cDPGS-MAP-RIL-pjf".

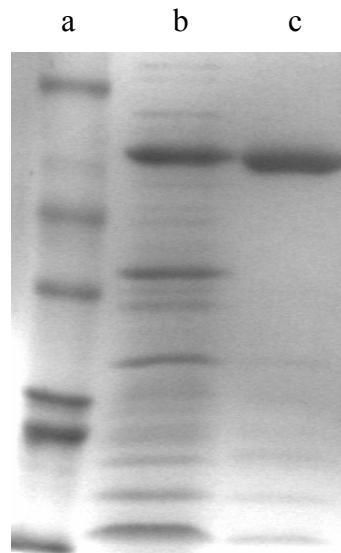


Abb. 11: Elektropherogramm von je 2 µg Roh-Extrakt rekombinanter cDPGS aus *E. coli* BL21(DE3) nach Hitzefällung. a: Marker; b: Mfe-cDPGS-MAP-pjf; c: Mfe-cDPGS-MAP-RIL-pjf.

3.3.2 Makromolekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten cDPGS

Im denaturierenden SDS-Gel zeigte die rekombinante cDPGS die gleiche elektrophoretische Mobilität wie die schneller wandernde Bande der cDPGS aus *Mt. fervidus*-Zellen (s. Abb. 9). Das apparente Molekulargewicht der Untereinheiten liegt damit wie das der unteren Bande der cDPGS aus *Mt. fervidus* bei 57 000. Für das native Enzym ergab sich nach Ausschluss-Chromatographie über Hiload 26/60 Superdex 200 prepgrade (s. Punkt 2.15.3) - wie für das Enzym aus *Mt. fervidus* - ein Molekulargewicht von 112 000.

Die kinetischen Parameter der rekombinanten cDPGS wurden bei 83° C sowohl in cDPG-Synthese- als auch in cDPG-Hydrolyse-Richtung ermittelt (Tab. 7). Deutliche Unterschiede zum Enzym, das aus *Mt. fervidus*-Zellen isoliert wurde, die bei 83°C gezogen wurden, ergaben sich in der maximalen Umsatzgeschwindigkeit der cDPG-Synthese: Die Werte der rcDPGS (V_{\max} : 16,0 (ATP) bzw. 17,2 (DPG) U mg⁻¹) liegen nur ½ so hoch wie die des aus *Mt. fervidus* isolierten Enzymes (V_{\max} : 32,0 (ATP) bzw. 32,8 (DPG) U mg⁻¹) (vergl. Tab. 5 und Tab. 7).

Tab. 7: Kinetische Eigenschaften der rekombinanten cDPGS aus *E. coli*.^a

Reaktion	variables Substrat	K_M (mM)	V_{\max} (U mg ⁻¹)
cDPG-Synthese ^b	ATP	3,0 ± 1,5	16,0 ± 2,0
	DPG	5,9 ± 2,5	17,2 ± 2,0
cDPG-Hydrolyse ^c	ADP	4,1 ± 0,8	3,9 ± 0,5
	cDPG	44,9 ± 5,0	3,8 ± 0,5

^a Assay Bedingungen: 10 mM TES/KOH (pH = 7,0); 875 mM KCl; 5 mM DTT; 83° C (n = 5-7)

^b Konzentration der invariablen Substrate: 40 mM DPG und 15 mM ATP

^c Konzentration der invariablen Substrate: 100 mM cDPG; 17 mM ADP; 50 mM P_i

3.4 Temperatur-Einfluss auf die phänotypische Ausprägung der cDPGS in *Mt. fervidus*

Um die molekularen Hintergründe zu verstehen, die hinter der temperaturabhängigen Veränderung der intrazellulären cDPG-Konzentration in *Mt. fervidus* stehen, sollte in den folgenden Ansätzen untersucht werden, inwieweit die cDPGS an der temperaturgesteuerten Regulation des cDPG-Pools beteiligt ist.

3.4.1 Einfluss der Temperatur auf das Isomerenverhältnis der cDPGS

Für eine möglichst direkte Detektion der cDPGS in Roh-Extrakten von *Mt. fervidus* wurde die Western Blot-Immuno-Technik angewandt. Die Analyse des Isomerenverhältnisses des Enzymes wurde mit Antiseren gegen die rekombinante cDPGS (SDS-denaturierte cDPGS, s. Punkt 2.14) durchgeführt.

In Kontrollversuchen mit Roh-Extrakten von *Mt. fervidus*, der bei der optimalen Temperatur von 83° C gezogen wurde, zeigten beide cDPGS-Isoformen äquivalente Reaktivität mit dem aus Kaninchen gewonnenen anti-cDPGS-Serum (Abb. 12). Das Verhältnis der beiden Banden nach Immundetektion entspricht dem, wie es nach Protein-Färbung im Anschluss im PAGE beobachtet wurde (vgl. Abb. 9 und Abb. 12).

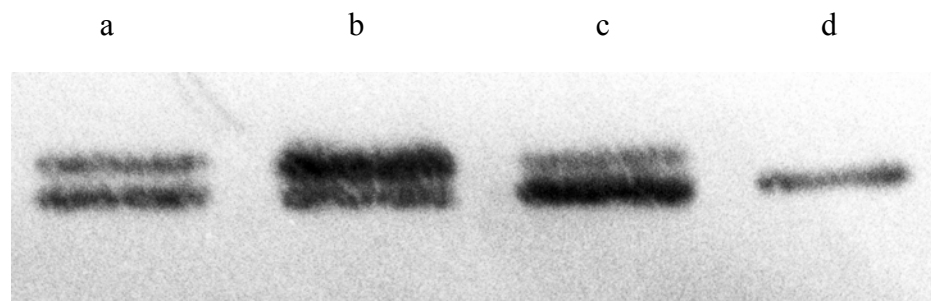


Abb. 12: Western Blot-Analyse von *Mt. fervidus*-cDPGS mit Hilfe von anti-cDPGS-Serum.

a, b, c: Extrakte aus logarithmischen Kulturen von *Mt. fervidus*; a: Kultur bei const. 83° C; b: Kultur nach 24 h Temp.-Erhöhung von 83 → 93° C; c: Kultur nach 24 h Temp.-Erniedrigung von 83 → 68° C; d: rekombinante cDPGS.

Mit Hilfe dieses immunologischen Testverfahrens wurde die Ausprägung der cDPGS in *Mt. fervidus* nach Veränderung der Wachstumstemperatur verfolgt. Die Untersuchungen wurden in dem gleichen Versuchsansatz durchgeführt, der auch über die Veränderung der intrazellulären cDPG-Konzentration nach einer Temperatur-Erhöhung von 83° C auf 93° C bzw. nach einer Temperatur-Erniedrigung von 83° C auf 68° C Auskunft geben sollte (s. Punkt 2.5.2).

In Abb. 13 sind die Western Blot-Analysen von cDPGS aus *Mt. fervidus*-Zellen, welche in der logarithmischen und der stationären Wachstumsphase einer Temperatur-Änderung unterzogen wurden, dargestellt. Wie man erkennen kann, nimmt nach einer Erhöhung der Anzucht-

Temperatur die obere Bande der cDPGS deutlich zu, während bei einer Temperatur-Erniedrigung die untere Bande zunehmend stärker wird. Western Blots mit Kontrollansätzen, die bei const. 83° C angezogen wurden, zeigten über die Zeit von 24 h keine Änderung im Verhältnis der beiden Banden. Densitometrische Analysen (Software Quantity One, 4.21, Biorad, München) der Western Blot-Analysen wiesen darauf hin, dass sich bei Temperatur-Absenkungen oder -Anhebungen in der logarithmischen oder der stationären Wachstumsphase das Verhältnis beider Protein-Banden nahezu parallel zu den Änderungen der intrazellulären cDPG-Konzentrationen verschiebt. So haben sich *Mt. fervidus*-Zellen, die in der logarithmischen Wachstumsphase einer Temperatur-Erniedrigung von 83 auf 68° C unterzogen wurden, bezüglich der cDPGS-Bandenrelation und der cDPG-Konzentration bereits nach 9 h auf das neue Temperatur-Niveau eingestellt (Abb. 14). Die maximale Verschiebung der cDPGS-Banden korreliert mit einer nahezu vollständigen Annäherung an die minimale cDPG-Konzentration (nach 24 h) (relative Intensität der unteren zur oberen Bande unmittelbar vor der Temperatur-Umstellung [%]: 57:43, nach 9 h: 76:24, nach 24 h: 75:25; cDPG-Konzentration: unmittelbar vor der Temperatur-Umstellung: 1,25 $\mu\text{mol mg}^{-1}$, nach 9 h: 0,96 $\mu\text{mol mg}^{-1}$, nach 24 h: 0,93 $\mu\text{mol mg}^{-1}$, vgl. auch Abb. 5). Eine entsprechende Korrelation ergibt sich auch aus der Analyse von Zellen, mit denen in der logarithmischen Phase eine Temperatur-Änderung von 83 auf 93° C durchgeführt wurde: die Verschiebung der Bandenrelation zugunsten der oberen Bande ist nach 9 h praktisch abgeschlossen (relative Intensität der unteren zur oberen Bande unmittelbar vor der Temperatur-Umstellung [%]: 53:47, nach 9 h: 34:66, nach 24 h: 37:63). Diese Verschiebung korreliert mit der Konzentrationsänderung von cDPG, die ausgehend von einer intrazellulären Konzentration von 1,23 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ direkt vor der Temperatur-Anhebung mit 1,54 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ nach 9 h nahezu die maximale Konzentration von 1,59 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ (nach 24 h) erreicht (vgl. auch Abb. 5). Auch hier haben sich die *Mt. fervidus*-Zellen bezüglich der Bandenrelation und cDPG-Konzentration bereits nach 9 h auf das neue Temperatur-Niveau eingestellt.

Bei Zellen, die bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase bei 83° C angezogen und mit denen dann entsprechende Temperatur-Änderungen durchgeführt wurden, ließen sich analoge Ergebnisse ermitteln (Abb. 15): auch hier entsprechen nach Temperatur-Erniedrigung von 83 auf 68° C die Bandenrelationen nach 9 h bereits denen nach 24 h (relative Intensität der unteren zur oberen Bande unmittelbar vor der Temperatur-Umstellung [%]: 55:45, nach 9 h: 74:26, nach 24 h: 79:21). Die intrazelluläre cDPG-Konzentration lässt sich ebenso mit diesen densitometrischen Messungen korrelieren und sinkt von 1,26 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ (Ausgangskonzentration direkt vor der Temperatur-Umstellung) auf 0,98 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ nach 9 h ebenfalls annähernd auf die Endkonzentration von 0,94 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ (nach 24 h) ab (vgl. auch Abb. 6). Zellen, mit denen eine Temperatur-Erhöhung von 83 auf 93° C in der stationären Wachstumsphase durchgeführt wurde, haben sich ebenfalls nach 9 h dieser Bedingung angeglichen: die relativen Bandenverhältnisse entsprechen bereits den Verhältnissen nach 24 h (relative Intensität der unteren zur oberen Bande unmittelbar vor der Temperatur-Umstellung [%]: 52:48, nach 9 h: 31:69, nach 24 h: 30:70). Parallel dazu steigt die cDPG-Konzentration der Zellen von 1,29 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ (Ausgangswert unmittelbar vor der Temperatur-Anhebung) mit 1,58 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ nach 9 h praktisch auf den

maximalen Wert von $1,63 \mu\text{mol mg}^{-1}$ (nach 24 h) an (vergl. auch Abb. 6). Diese Ergebnisse weisen auf eine Korrelation des cDPGS-Phänotyps mit dem intrazellulären cDPG-Gehalt hin.

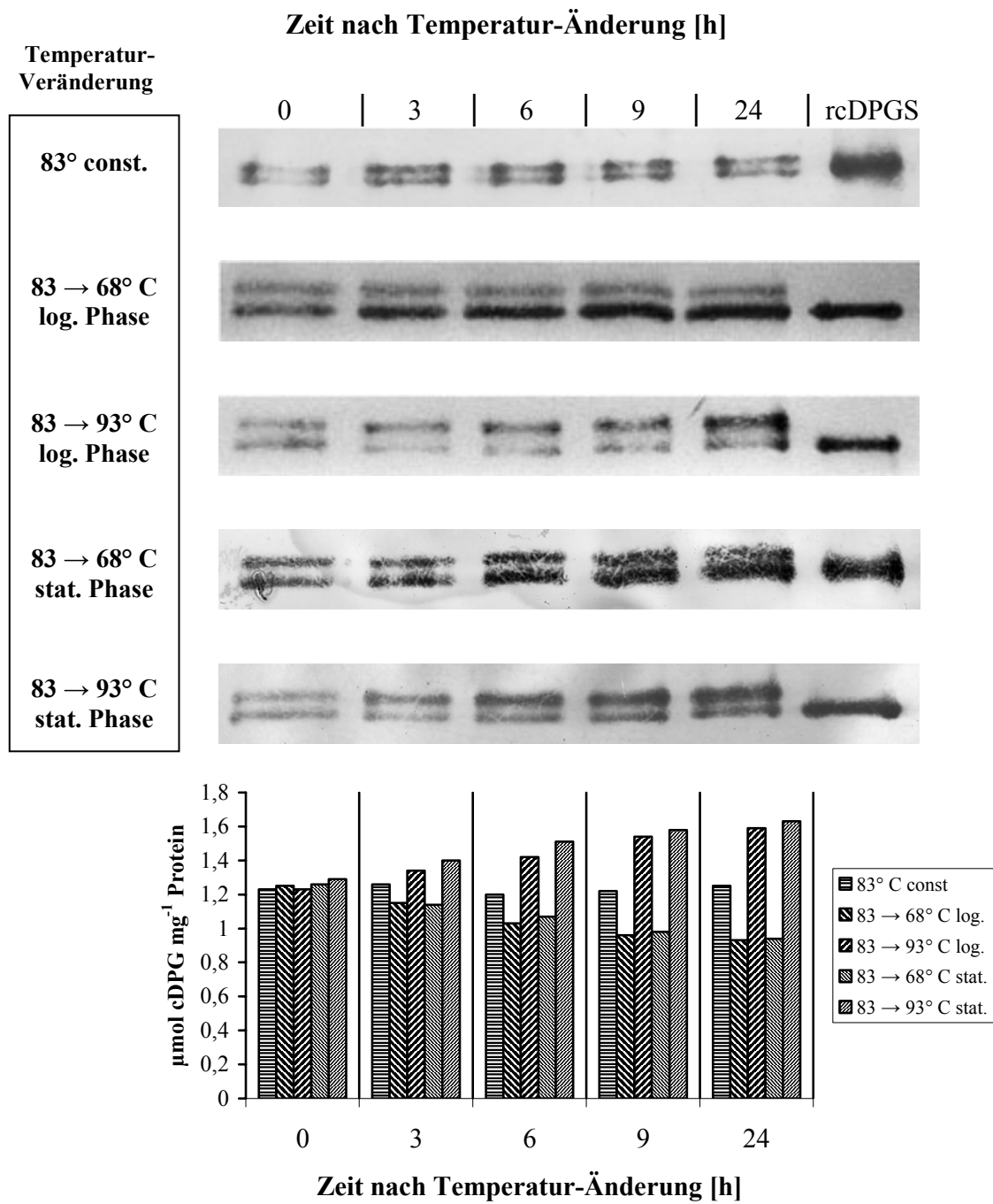


Abb. 13: Western Blot-Analyse von cDPGS aus *Mt. fervidus* und dazugehörige intrazelluläre cDPG-Konzentration.

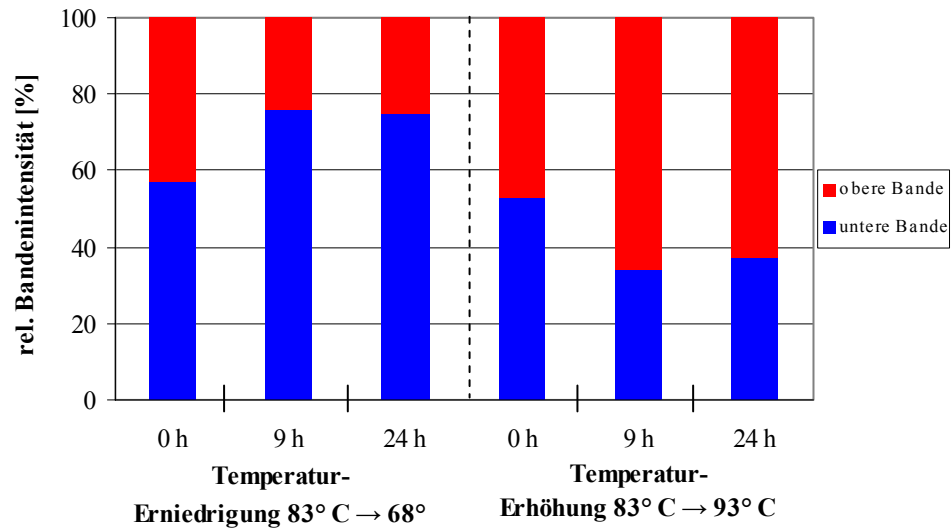


Abb. 14: Änderung des Verhältnisses zwischen beiden cDPGS-Isoformen nach Erniedrigung (83° C → 68° C) bzw. Erhöhung (83° C → 93° C) der Anzucht-Temperatur in der logarithmischen Wachstumsphase. Die Bandenstärke wurde nach Western Blot-Analyse densitometrisch ermittelt.

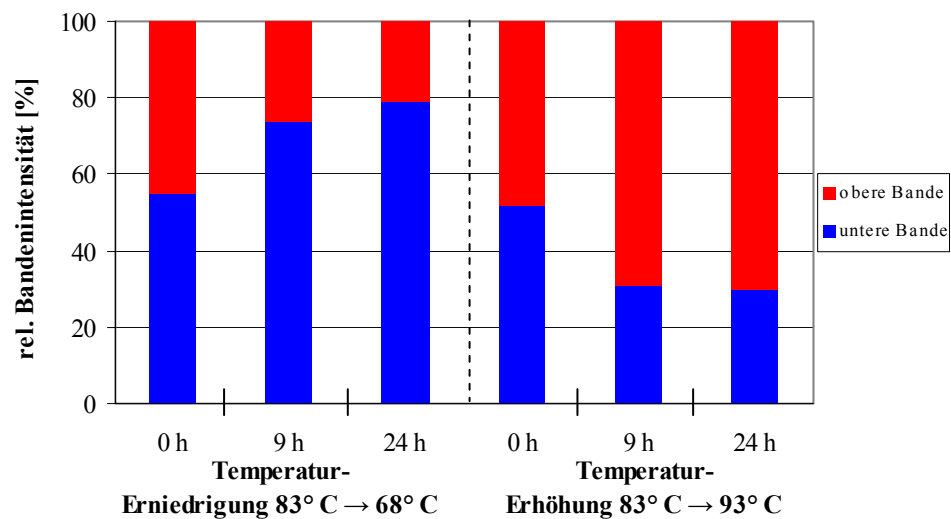


Abb. 15: Änderung des Verhältnisses zwischen beiden cDPGS-Isoformen nach Erniedrigung (83° C → 68° C) bzw. Erhöhung (83° C → 93° C) der Anzucht-Temperatur in der stationären Wachstumsphase. Die Bandenstärke wurde nach Western Blot-Analyse densitometrisch ermittelt.

3.4.2 Kinetische Eigenschaften der Hoch- und Niedertemperatur-Variante der cDPGS von *Mt. fervidus*

Aus Zellextrakten von Kulturen der logarithmischen Wachstumsphase, geerntet 24 h nach Temperatur-Umstellung, wurde die cDPGS isoliert und enzymkinetisch untersucht. Die Sättigungskinetiken mit Substrat und Cosubstrat wurden wegen der hohen Labilität des reinen Enzymes nach Zellaufschluss mit partiell aufgereinigtem Enzym (Aufreinigung über Phenylsepharose- und Hydroxylapatit-Säulen-Chromatographie, vgl. Punkt 2.10.1.2 und 2.10.1.3) durchgeführt. Die Ermittlung der V_{\max} -Werte erfolgte über Stichpunkt-Messungen mit einer vollständig gereinigten Enzym-Fraktion. Dazu wurde die jeweils maximale, minimale und eine mittlere Konzentration des für die jeweilige Kinetik einzusetzenden variablen Substrates verwendet.

Messungen mit der Hochtemperatur-Variante des Enzymes ergaben einen dreifach höheren V_{\max} -Wert in cDPG-Synthese-Richtung verglichen mit der cDPGS aus Zellen, die bei const. 83° C angezogen wurden. Der K_M -Wert für ATP und DPG liegt etwas niedriger (allerdings nicht signifikant) als bei der 83° C-Kontrolle. In Richtung des cDPG-Abbaus ergaben die Messungen für diese Form verglichen zur Kontrolle hingegen deutlich niedrigere V_{\max} -Werte bei leicht erhöhten K_M -Werten (Tab. 8, vgl. auch Tab. 5).

Tab. 8: Kinetische Eigenschaften der Hoch- und Niedertemperatur-Variante der cDPGS.^a

	Reaktion	variables Substrat	K_M (mM)	V_{\max} (U mg ⁻¹)
Hoch- temperatur- Variante	cDPG Synthese ^b	ATP	2,5 ± 1,5	92,4 ± 2,0
		DPG	4,8 ± 2,5	88,2 ± 2,0
	cDPG Hydrolyse ^c	ADP	5,8 ± 2,5	2,7 ± 0,5
		cDPG	52,0 ± 3,0	2,4 ± 0,5
Nieder- temperatur- Variante	cDPG Synthese ^b	ATP	3,6 ± 1,5	22,3 ± 2,0
		DPG	6,7 ± 1,5	24,1 ± 2,0
	cDPG Hydrolyse ^c	ADP	3,4 ± 1,0	5,0 ± 0,5
		cDPG	37,5 ± 5,0	5,1 ± 0,5

^a Assay Bedingungen: 10 mM TES/KOH (pH = 7,0); 875 mM KCl; 5 mM DTT; 83° C (n = 5-7)

^b Konzentration der invariablen Substrate: 40 mM DPG und 15 mM ATP

^c Konzentration der invariablen Substrate: 100 mM cDPG; 17 mM ADP; 50 mM P_i

Demgegenüber zeigte die Niedertemperatur-Variante des Enzymes einen um ca. 1/3 niedrigeren V_{\max} -Wert in cDPG-Synthese-Richtung bezogen auf das Enzym, das aus const. bei 83° C angezogenen Zellen isoliert wurde, während der K_M -Wert einen leicht (nicht signifikant) erhöhten Wert erkennen ließ. Messungen in cDPG-Hydrolyse-Richtung ergaben hier niedrigere K_M -Werte und die höchsten V_{\max} -Werte aller Enzym-Varianten (s. Tab. 8, vgl. auch Tab. 5).

Weiter wurde geprüft, ob sich die Hochtemperatur- und die Niedertemperatur-Variante der cDPGS in regulativen Eigenschaften unterscheiden. So erfolgten Untersuchungen beider Varianten bezüglich ihrer funktionellen Beeinflussbarkeit durch Energiemetabolite und Intermediate. Alle Enzym-Untersuchungen fanden unter Ausschluss von Luftsauerstoff statt. Zur Eingrenzung der wirksamen Substanzen wurden in cDPG-Synthese-Richtung bei halbsättigenden Konzentration für die Substrate (5 mM DPG und 2,5 mM ATP für die Hochtemperatur-Variante, 7 mM DPG und 3,5 mM ATP für die Niedertemperatur-Variante) eine Reihe verschiedener Metabolite hinsichtlich ihres Einflusses auf die Aktivität des Enzymes getestet (Konzentration: 3 mM; s. Tab. 9). Mit beiden Enzym-Varianten wurden Kontrollmessungen ohne Zusatz potentieller Effektoren durchgeführt. Bei der Hochtemperatur-Variante wurden keine nennenswerten Effekte ($< 20\%$) mit den Substanzen NADP^+ , NADPH, NADH und Ribose-5-Phosphat beobachtet. Schwach inhibierend wirkten AMP und Fructose-1-Phosphat. Glucose-1-Phosphat, Glucose-6-Phosphat und Fructose-6-Phosphat wiesen eine stärker hemmende Wirkung auf. ADP zeigte einen leicht aktivierenden, 3-PG und PEP einen stärker aktivierenden Einfluss auf diese Enzymform.

Bei entsprechenden Messungen mit der Niedertemperatur-Variante zeigten sich für NADP^+ , NADPH, NADH und Ribose-5-Phosphat ebenfalls keine auffälligen Effekte. Schwach inhibierend wirkten Fructose-1-Phosphat und Fructose-6-Phosphat. Glucose-6-Phosphat und Glucose-1-Phosphat wirkten auch hier stark inhibierend, wobei jedoch der Einfluss von Glucose-1-Phosphat verglichen zur Hochtemperatur-Variante schwächer war. Stärker ist allerdings der inhibierende Einfluss des AMP auf diese Enzymform, der hier doppelt so hoch ausfiel wie bei Messungen mit der Hochtemperatur-Variante. ADP zeigte hier ebenfalls eine leicht aktivierende Wirkung, die vergleichbar zu denen von 3-PG und PEP ist. Der aktivierende Einfluss dieser beiden Komponenten war bei der Niedertemperatur-Variante schwächer ausgeprägt als bei der Hochtemperatur-Variante.

Tab. 9: cDPG-Synthese einer Hoch- bzw. Niedertemperatur-Variante der cDPGS in Gegenwart verschiedener Additive.

Additiv [3 mM]	Hochtemperatur-Variante gebildetes cDPG nach 20-minütiger Inkubationszeit in % der Kontrolle	Niedertemperatur-Variante gebildetes cDPG nach 20-minütiger Inkubationszeit in % der Kontrolle
ohne Additiv	100	100
NADP ⁺	96	99
NADPH	101	100
NADH	98	96
R-5-P	100	98
AMP	76	52
F-1-P	68	72
F-6-P	53	69
G-1-P	42	54
G-6-P	42	46
ADP	122	131
3-PG	154	128
PEP	161	133

Testbedingungen: 10 mM TES/KOH (pH = 7,0); 300 mM KCl; 7,5 mM DTT; 3 mM Additiv; Hochtemperatur-Variante: 5 mM DPG und 2,5 mM ATP, Ernte 24 h nach Temperatur-Erhöhung von 83° C auf 93° C; Niedertemperatur-Variante: 7 mM DPG und 3,5 mM ATP; Ernte 24 h nach Temperatur-Erniedrigung von 83° C auf 68° C.

3.5 Analyse struktureller Unterschiede zwischen den beiden cDPGS-Isoformen

Ziel der Versuche war es, die strukturellen Unterschiede zu erfassen, durch die sich die beiden im SDS-Gel auftrennbaren Isoformen der cDPGS von *Mt. fervidus* unterscheiden. Die identischen N-terminalen Aminosäure-Sequenzen und die vergleichbare Antigenität beider Protein-Species weisen auf eine hohe strukturelle Ähnlichkeit beider Formen hin. Generell ist denkbar, dass es sich bei den beiden Protein-Species um verschiedene Konformere oder um kovalent modifizierte - d.h. posttranskriptionell veränderte - Varianten eines Proteins handelt. Da in Southern Blot-Analysen nur jeweils ein DNS-Fragment mit der Nucleotid-Sonde hybridisiert, gehen wir davon aus, dass die beiden Protein-Species nicht von verschiedenen Genen codiert werden.

Der relativ deutliche Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit beider Banden (s. Abb. 9) lässt eine klare Differenz der molekularen Masse beider Protein-Species erwarten. Diese Erwartung konnte nicht durch massenspektrometrische Untersuchungen, die in Zusammenarbeit mit der AG F. Lottspeich (MPI Martinsried) und AG H. E. Meyer (Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt wurden, bestätigt werden. So ergaben die Messungen von Enzympräparationen aus *Mt. fervidus*, die beide Species enthielten, lediglich das Molekulargewicht von $50\,663 \pm 6$ (AG Lottspeich) bzw. $50\,653 \pm 1$ (AG Meyer) (theoretisches Molekulargewicht: 50 657,1). Eine Differenzierung in zwei Formen war nicht möglich. Aus diesen Ergebnissen muss geschlossen werden, dass der Massenunterschied zwischen den beiden Protein-Species eher gering ist. Dies

wurde durch eine Reihe von chemischen Analysen bestätigt, die keinen Hinweis auf Phosphorylierung, ADP-Ribosylierung oder Glycosylierung lieferten (s. Punkt 2.11). Mit saurer oder alkalischer Phosphatase im entsprechenden pH-Milieu behandelte Proben des Enzymes zeigten nach einstündiger Inkubation bei 37° C und anschließender gelelektrophoretischer Analyse das gleiche Verhältnis beider Banden wie unbehandelte Proben. Weitere Proben des Enzymes wurden mit Phosphodiesterase bzw. in alkalischem Milieu ebenfalls 1 h bei 37° C behandelt, um eine potentielle ADP-Ribosylierung in Betracht ziehen zu können. Diese Proben wiesen nach gelelektrophoretischer Auftrennung ebenfalls ein unverändertes Doppelbanden-Muster auf. In einem weiteren Versuch erfolgte eine Untersuchung der cDPGS auf mögliche Glycosylierungen. Die Aliquots wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Diese Membran wurde mit Perjodat inkubiert, um nicht-reduzierende Monosaccharide zu oxidieren, das Oxidationsprodukt mit Biotin markiert und dieses mit Streptavidin-Alkalischer Phosphatase inkubiert. Nach Zugabe von NBT-BCIP erfolgt bei Vorliegen einer Glycosylierung ein Farbniederschlag. Für cDPGS konnte mit dieser Methode jedoch kein Signal detektiert werden. Um zu analysieren, ob es sich zumindest bei einer der beiden Enzym-Isoformen um ein Phosphoryl-Intermediat handelt, welches unter Verwendung von γ -Phosphat des für die cDPG-Synthese benötigten ATPs gebildet wurde, führte man eine cDPG-Synthesereaktion mit cDPGS unter Verwendung von ^{32}P - γ -ATP durch. Diese Proben wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel nach Trocknung über einen Zeitraum von 4 Tagen autoradiographiert, wobei keine radioaktiv markierte Untereinheit detektiert wurde. Andererseits scheint die unterschiedliche elektrophoretische Mobilität nicht nur auf konformellen Unterschieden zu beruhen: In zwei Parallelansätzen wurde ein Aliquot des Enzymes in Gegenwart von 10 M Harnstoff bzw. Guanidinhydrochlorid (GuHCl) 2 h bei 90° C inkubiert. Sowohl die in GuHCl als auch in Harnstoff vollständig denaturierte cDPGS zeigte nach Dialyse - zur Entfernung des Denaturans - im SDS-Gel wiederum die Aufspaltung in beide Banden mit annähernd gleicher Ausprägung beider Species. In einem weiteren Ansatz wurden cDPGS-Aliquots zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt und gefärbt. Danach wurden die Banden getrennt aus dem Gel geschnitten, die erhaltenen Gelstücke zerrieben und diese Fragmente einer erneuten Elektrophorese unterzogen. Aufgrund der starken Verluste während dieser Aufarbeitung musste dieses zweite Gel silbergefärbt werden (s. Punkt 2.15.7.2). Das Gel-Elektropherogramm zeigte für die untere Bande ausschließlich ein dem ursprünglichen Bild entsprechendes Signal, aber keinerlei Bildung einer oberen Bande durch diese Behandlung (Abb. 16). Die obere Bande hingegen zeigte neben der zu erwartenden Bande eine schwache untere Bande, deren Laufstrecke nicht eindeutig zuzuordnen ist. Zwar wurde beim Ausschneiden der gefärbten Banden des ersten Geles besonderer Wert auf eine Trennung beider Isoformen voneinander gelegt, dennoch könnten eventuell Reste der unteren Bande mit in die Probe der oberen Bande gelangt sein, welche im zweiten Gel erneut angefärbt wurden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass diese - möglicherweise dritte - Species ein Resultat der während der Vorbereitungen für die Elektrophorese (s. Punkt 2.15.5) bzw. bei der Coomassie-Färbung des

Gels (s. Punkt 2.15.7.1) auftretenden sauren pH-Werte ist, für die ausschließlich diese, im ursprünglichen Gel als obere Bande sichtbare Protein-Form sensitiv ist.

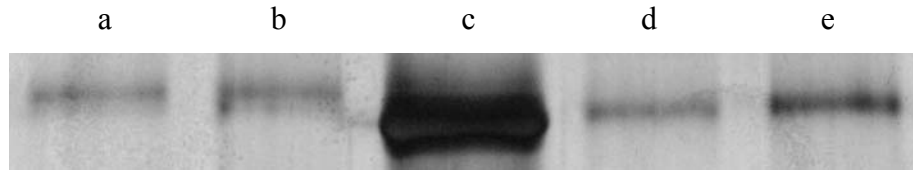


Abb. 16: Elektropherogramm einer SDS-PAGE mit cDPGS aus *Mt. fervidus*. a und b: ausgeschnittene und zerriebene obere Bande der cDPGS aus *Mt. fervidus* nach zweiter elektrophoretischer Analyse; c: rcDPGS; d und e: ausgeschnittene und zerriebene untere Bande der cDPGS aus *Mt. fervidus* nach zweiter elektrophoretischer Auftrennung.

Möglicherweise sind eine oder mehrere Deamidierungsreaktionen Ursache für das Auftreten der beiden Isoformen: Gln und insbesondere Asn-Reste sind – in Abhängigkeit von ihrer unmittelbaren Nachbarschaft in der Protein-Kette – anfällig gegenüber diesen Reaktionen (Bischoff und Kolbe, 1994); die Masse des Reaktionsproduktes unterscheidet sich dabei nur um 1 Da von der des Edukts.

Der Verdacht, entsprechende Reaktionen könnten Ursache für die beobachtete cDPGS-Isoformen-Bildung sein, wurde durch Hitze-Inkubationsversuche mit der rekombinanten cDPGS in diese Richtung gelenkt. So entsteht nach 10-minütiger Inkubation bei 93° C in 10 oder 100 mM Phosphatpuffer (pH = 6,5) eine Protein-Species, die in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit der oberen Protein-Bande der *Mt. fervidus*-cDPGS entspricht und in Western Blot-Analysen detektiert werden kann (Abb. 17).

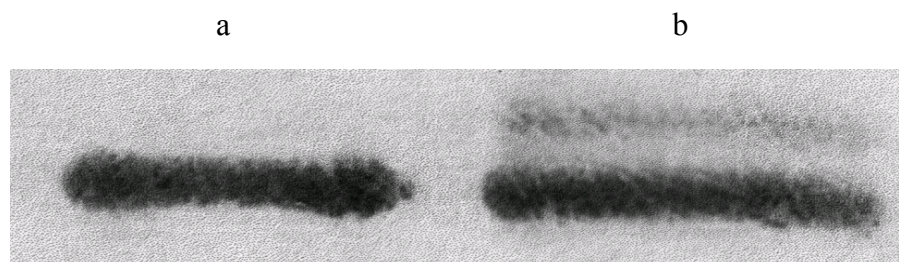


Abb. 17: Western Blot-Analyse mit rekombinanter cDPGS. a: Kontrolle; b: nach 10 min 93° C in 10 mM Phosphatpuffer (pH = 6,5).

Bemerkenswerterweise konnte bei keinem der durchgeführten Parallelansätze ein vollständiger Übergang von der unteren in die obere Bande erzielt werden. Nach über 20-minütiger Inkubation wird die obere Bande zunehmend diffus. Offensichtlich nehmen unter diesen Bedingungen hydrolytische Reaktionen überhand. Mit der ursprünglichen und mit der wie oben beschrieben modifizierten cDPGS wurde ein cDPG-Synthese-Test durchgeführt. Nach 10 und 20 min

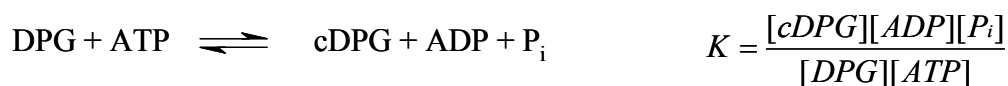
Inkubationsdauer zeigte die modifizierte cDPGS eine 18 %-ig höhere Produktion als die unbehandelte Probe.

3.6 Versuche zur biotechnologischen Produktion von cDPG

3.6.1 *In vitro*-Verfahren

Durch die Klonierung des *cpgS*-Gens in *E. coli* war es möglich, von DPG ausgehend cDPG *in vitro* zu synthetisieren.

Wie in den analytischen Tests zur Bestimmung der cDPGS-Aktivität (s. Punkt 2.10.2) wurden die cDPG-Versuche in 10 mM TES/KOH (pH = 7,0) durchgeführt. Für die Kalkulation der Ausbeute wurde zunächst die Gleichgewichtskonstante der Reaktion



bestimmt. Um zu vermeiden, dass der thermogene Zerfall der Edukte (DPG, ATP) bzw. der Produkte (insbesondere ADP) eine Gleichgewichtseinstellung verhindert, wurden für diese Versuche relativ niedrige Reaktionstemperaturen (30-50° C) gewählt. Der Zeitverlauf der cDPG-Bildung ist exemplarisch bei 30° C dargestellt (Abb. 18).

Die Reaktion wurde in Gegenwart von 3 mg ml⁻¹ rcDPGS durchgeführt, wobei die Enzympräparation über Hitzefällung des Roh-Extraktes von Zellen des Expressionsstammes Mfe-cDPGS-MAP-pjf (vgl. Abb. 9) und anschließender Dialyse (10 mM TES/KOH (pH = 7,0), 500 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 7 mM DTT) erfolgte. Um die Ausbeute zu steigern, wurde die Konzentration der Edukte ATP und DPG auf jeweils 50 mM erhöht. Eine weitere Anhebung der Edukt-Konzentration schien aus Kostengründen nicht angebracht. Weiter enthielt der Syntheseansatz 500 mM KCl und 50 mM MgCl₂ (Gewährleistung der Stabilität und Aktivität des Enzymes) bzw. 7 mM DTT (Oxidationsschutz des Enzymes). Als weitere produktionsfördernde Maßnahmen wurden die Präparationen des Enzymes und die eigentliche Reaktion unter weitgehend anaeroben Bedingungen durchgeführt. So erfolgte der Ansatz in einer Schottflasche, die vorher im Anaeroben-Zelt mehrere Tage in einem Gemisch aus N₂, CO₂ und max. 4 % H₂ bestehender sauerstofffreier Atmosphäre äquilibriert worden ist.

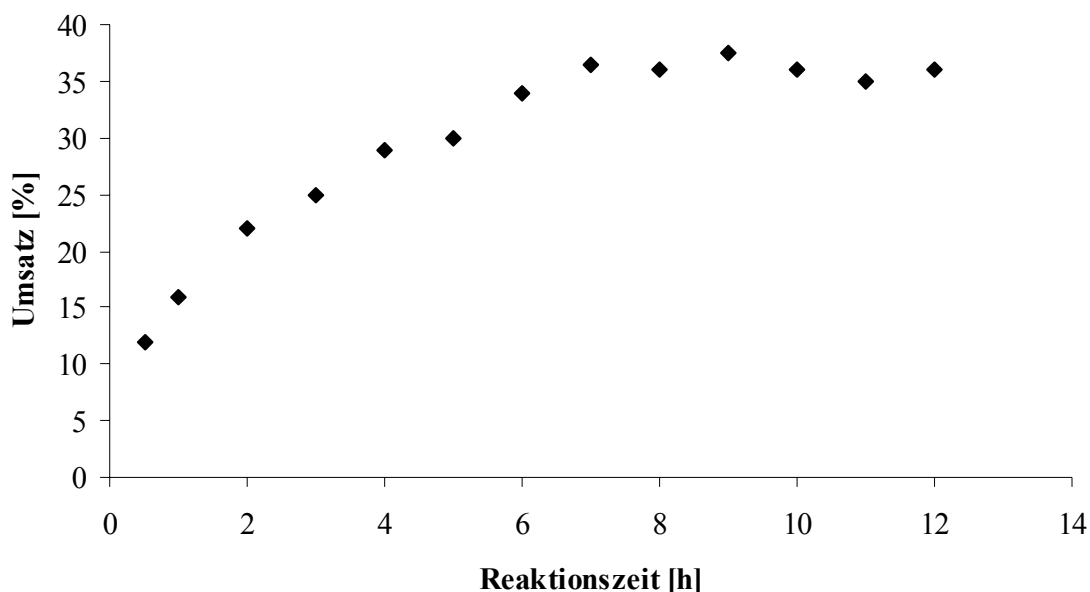


Abb. 18: Kinetik einer *in vitro*-cDPG-Synthese unter Verwendung von rcDPGS bei 30° C.
Anaerobe Bedingungen mit 10 mM TES/KOH-Puffer (pH = 7,0). Nähere Erläuterungen s. Text.

Wie in Abb. 19 dargestellt, verschiebt sich das Gleichgewicht mit zunehmender Temperatur zu Ungunsten der cDPG-Synthese. Demnach sollten bei niedrigen Temperaturen höhere Ausbeuten erzielt werden. Allerdings geht eine Erniedrigung der Reaktionstemperatur zu Lasten der Reaktionsgeschwindigkeit. Als Kompromiss wurde für die Standardansätze eine Temperatur von 30° C gewählt; die Reaktionsdauer bis zur Gleichgewichtseinstellung lag hier bei 9 h (vgl. Abb. 18). Ein cDPG-Ansatz wurde im typischen Fall mit einem Gesamtvolumen von 25 ml durchgeführt (Edukte: 1,25 mmol DPG und ATP, s. Punkt 2.9.2.2). Nach Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes wurde der pH-Wert von 7,0 auf 8,4 angehoben und durch Zugabe von alkalischer Phosphatase und anschließender Inkubation bei 37° C das nicht umgesetzte DPG dephosphoryliert. Nach Neutralisation wurde der Ansatz zentrifugiert (5 min, 5 000 x g), um präzipitiertes Protein zu entfernen. Der cDPG-haltige Überstand wurde auf eine Q-Sepharose (1,6 x 10 cm, Flussrate 0,4 ml min⁻¹) aufgetragen, um unter Anlage eines linearen Ammonium-Acetat-Gradienten (10 mM - 1,0 M; Gesamtvolumen: 270 ml) cDPG von anderen niedermolekularen Bestandteilen des Reaktionsgemisches zu trennen. Ammonium-Acetat wurde durch mehrmalige Lyophilisation (Speedvac, Savant) und anschließender Gelfiltration über Sephadex G10 entfernt. Anschließend wurde das cDPG mit Hilfe von DOWEX 50W x 4 und nachfolgender Neutralisation mit KOH in sein Kaliumsalz überführt. Unter Einsatz von 1,25 mmol DPG und ATP wurde eine Produktion von 0,45 mmol cDPG erreicht. Die anschließende oben beschriebene Aufreinigung erbrachte eine Ausbeute von 0,38 mmol des Kaliumsalzes von cDPG.

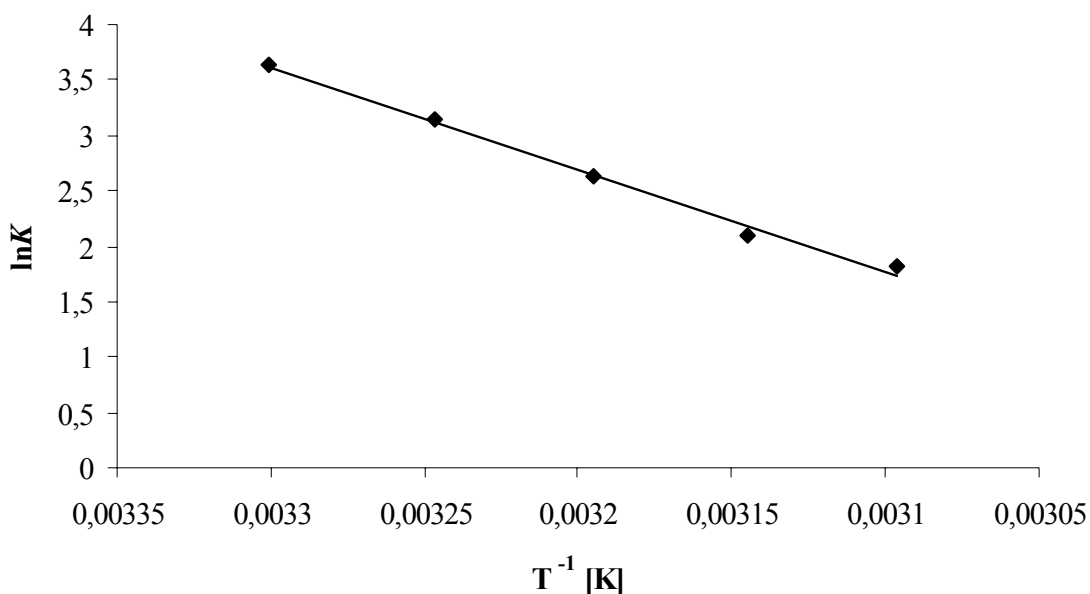


Abb. 19: Van't-Hoff-Plot zur Temperatur-Abhängigkeit des cDPGS-Reaktionsgleichgewichtes. $\ln K$, logarithmus naturalis der Gleichgewichtskonstante; T^{-1} , Kehrwert der absoluten Reaktionstemperatur.

3.6.2 *In vivo*-Verfahren

In einem Alternativ-Verfahren wurde cDPG durch einen rekombinanten *E. coli*-Stamm synthetisiert. Da in *Mt. fervidus* die cDPG-Produktion über einen Seitenweg der Glycolyse verläuft, ließ sich vermuten, dass *E. coli*, wenn er die zur Synthese notwendigen Enzyme 2-PGK und cDPGS zur Verfügung hätte, ebenfalls in der Lage sein könnte die niedermolekulare Substanz zu produzieren. Die folgenden gentechnischen Arbeiten wurden freundlicherweise von B. Tjaden durchgeführt. Für dieses Experiment wurde *E. coli* BL21(DE3) als Expressionsstamm ausgewählt. Die beiden Gene der 2-PGK und der cDPGS aus *Mt. fervidus* wurden unter Einbau geeigneter Restriktionsschnittstellen (2-PGK: *Nde*I und *Bgl*II, cDPGS: *Nco*I und *Bam*HI) durch PCR-Mutagenese amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden restringiert und in pET24a (*2pgk*) bzw. in pET15b (*cpgS*) inseriert. Beide rekombinanten Plasmide wurden jeweils in kompetente *E. coli* DH5 α transformiert und die Klone anschließend durch Restriktionsanalyse überprüft. Zur heterologen Expression der einzelnen Enzyme wurden kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit dem Plasmid pET24a+*2pgk* bzw. pET15b+*cpgS* transformiert. Die Expression des jeweiligen (aktiven) Proteins wurde über Aktivitätsmessungen (s. Punkt 2.8.3) geprüft. Schließlich wurden die Enzyme gemeinsam durch Co-Transformation beider Plasmide in *E. coli* BL21(DE3) zur Expression gebracht. Die erfolgreiche Expression der beiden Enzyme wurde über SDS-PAGE und Aktivitätstests kontrolliert. Dieser Produktionsstamm erhielt die Bezeichnung Mfe-2-PGK-pET24a/cDPGS-pET15b. Der Gehalt der Zellextrakte an cDPG wurde ionenchromatographisch bestimmt.

Unter Standardbedingungen (Anzucht in LB-Medium bei 37° C, Induktion der Enzyme nach Erreichen einer $OD_{578} = 0,9$ mit 1 mM IPTG, Zellernte nach weiterer Inkubation von 6 h) konnten $5,3 \mu\text{mol cDPG mg}^{-1} \text{ Prot.}$ bestimmt werden. Da in *Mt. fervidus* die dreifach negative Ladung von cDPG durch K^{+} -Kationen ausgeglichen wird, wurde bei den Versuchen zur Steigerung der cDPG-Produktion in *E. coli* die Anzucht des Klons in KML-Medium durchgeführt. Hierbei ist statt des in LB-Medium enthaltenen NaCl KCl in gleicher Konzentration enthalten (Fairbairn *et al.*, 2000). Die Auswertungen ergaben eine leichte Steigerung der intrazellulären cDPG-Konzentration ($6,2 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ Prot.}$), daher wurde für die weiteren Versuche dieses Medium verwendet.

Zur Steigerung der cDPG-Produktion sind folgende Modifikationen der Anzuchtbedingungen durchgeführt worden: Variation der KCl-Konzentration des Mediums (Standard: 0,13 M; außerdem: 0,2, 0,25 und 0,3 M), Zugabe von Glucose in das Anzuchtmedium (2, 4, 10 und 20 g pro Liter Medium), Variation der IPTG-Induktionsphase (Standard: 6 h; außerdem: 4, 5 und 7 h), Reduktion der Sauerstoff-Versorgung, Temperatur-Erhöhung von 37° C auf 42° C und eine Kombination aus Anhebung der Temperatur (37° C \rightarrow 42° C) und der KCl-Konzentration (130 mM \rightarrow 250 mM) je 3 h nach IPTG-Induktion sowie Ansätze ohne IPTG-Induktion.

Die Zellen wurden nach ihrer Ernte bei -80° C gelagert. Für die Analysen wurden die Zellen durch French Press aufgeschlossen und die Zellbruchstücke abzentrifugiert (10 000 x g, 10 min). Zur Entfernung des Zellsaft-Proteins folgten eine TCA-Fällung und nach Neutralisation eine IC-Analyse (s. Punkt 2.8.1). In Ansätzen unter Zugabe verschiedener Mengen Glucose oder unter semianaeroben Bedingungen konnte kein intrazelluläres cDPG detektiert werden (Tab. 10). Eine Temperatur-Erhöhung auf 42° C nach vorheriger dreistündiger Inkubation bei 37° C nach IPTG-Zugabe erbrachte keine signifikante Steigerung der cDPG-Konzentration verglichen zur Kontrolle. Mit keinem der verwendeten Verfahren konnte eine signifikante Steigerung des im Kontrollansatz gefundenen intrazellulären cDPG-Gehaltes erzielt werden.

Bemerkenswert war, dass bei Ansätzen, mit denen keine IPTG-Induktion durchgeführt wurde, ebenfalls intrazelluläres cDPG detektiert werden konnte. Daraufhin wurde eine SDS-Elektrophorese mit diesen cDPG-haltigen Roh-Extrakten durchgeführt: Im Elektropherogramm konnten der cDPGS und der 2-PGK entsprechende Banden zugeordnet werden. Offenbar wurden die Enzym-Gene auch ohne IPTG-Induktion transkribiert. Die größten cDPG-Konzentrationen konnten bei Ansätzen in KML-Medium mit einem KCl-Gehalt von 250 mM detektiert werden, die im Anschluss an die IPTG-Induktion bei $OD_{597} = 0,9$ weitere 7 h bei const. 37° C inkubiert wurden. Bei diesem Ansatz mit IPTG-Induktion ließen sich $8,8 \mu\text{mol cDPG mg}^{-1} \text{ Prot.}$ detektieren. Bei einem Parallelversuch ohne IPTG-Induktion unter ansonsten identischen Bedingungen wurden nach 3 h $5,1 \mu\text{mol cDPG mg}^{-1} \text{ Prot.}$ nachgewiesen. Das sind 58 % des Ansatzes mit IPTG-Induktion. Allerdings lag der Proteingehalt dieses Ansatzes um 60 % höher, so dass die cDPG-Ausbeute mit der des IPTG-induktionsfreien Ansatzes vergleichbar war. Unter der Annahme einer cDPG-Konzentration von $8 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ Prot.}$ und einem durchschnittlichen Protein-Gehalt von 30 mg ml^{-1} errechnet sich eine cDPG-Konzentration von 240 mmol l^{-1} ; aus einem 100 l-Fermenter lässt sich eine Gesamtausbeute von ca. 24 mol cDPG erwarten.

Tab. 10: Experimente zur Steigerung der *in vivo*-Produktion von cDPG im rekombinanten *E. coli*-Stamm Mfe-2-PGK-pET24a/cDPGS-pET15b. Die Kontrollen entsprechen dem Durchschnittswert der intrazellulären cDPG-Konzentration mehrerer Parallel-Ansätze mit LB- bzw. KML-Medium, einer IPTG-Induktion bei $OD_{578} = 0,9$ und einer Induktionsphase von 6 h.

Versuchsansatz		cDPG-Konzentration [$\mu\text{mol mg}^{-1}$ Prot.]
1. Kontrolle A	(Medium: LB; Temperatur: 37° C; Schüttel-Kultur: 225 Upm; IPTG-Induktion: 6 h ab Erreichen der $OD_{578} = 0,9$)	5,3
2. Kontrolle B	(Medium KML; sonstige Bedingungen s. Kontrolle A)	6,2
3. Variation der KCl-Konzentration im KML-Medium (sonstige Bedingungen wie Kontrolle A):		
	0,13 M KCl	6,0
	0,20 M KCl	5,8
	0,25 M KCl	7,0
	0,30 M KCl	5,4
4. Glucosezusatz während der IPTG-Induktion (KML-Medium mit 250 mM KCl; Schüttel-Kultur; Temperatur: 37° C; IPTG-Zugabe bei $OD_{578} = 0,9$; Induktion 3 h ohne Glucose, anschließend 3 h mit Glucose:		
	2 g l ⁻¹	0
	4 g l ⁻¹	0
	10 g l ⁻¹	0
	20 g l ⁻¹	0
5. Variation der IPTG-Induktionsphase (KML-Medium mit 250 mM KCl)		
5.1 Zeitdauer der Induktionsphase nach Erreichen der $OD_{578} = 0,9$ (Schüttel-Kultur; Temperatur: const. 37° C):		
	4 h	6,5
	5 h	7,1
	6 h	7,2
	7 h	8,8
5.2 Temperatur-Erhöhung während der Induktionsphase (Schüttel-Kultur; IPTG-Induktion ab $OD_{578} = 0,9$): 3 h bei 37° C; anschließend Erhöhung der Temperatur auf 42° C und Inkubationsfortsetzung über:		
	1 h	2,7
	2 h	2,8
	3 h	2,2
	4 h	2,6
5.3 Reduktion der Sauerstoff-Versorgung (IPTG-Induktion ab $OD_{578} = 0,9$ bei const. 37° C): 3 h Induktion unter Schütteln (225 Upm), anschließend 3 h Inkubationsfortsetzung ohne Schütteln		0
5.4 Erhöhung von Temperatur und KCl-Konzentration während der IPTG-Induktionsphase (Schüttel-Kultur; IPTG-Induktion ab $OD_{578} = 0,9$): 3 h bei 37° C und KCl-Konzentration = 0,13 M; anschließend Erhöhung von a) Temperatur auf 42° C und b) KCl-Konzentration auf 0,25 M; Inkubationsfortsetzung über 6 h		3,0
6. Inkubation ohne IPTG-Induktion (KML-Medium mit 250 mM KCl, Schüttel-Kultur)		
6.1 Kultivierung bei const. 37° C; Zeit nach Erreichen der $OD_{578} = 0,9$:		
	1 h	3,0
	2 h	4,5
	3 h	5,1
	4 h	4,3
6.2 Temperatur-Erhöhung von 37° C auf 42° C 3 h nach Erreichen der $OD_{578} = 0,9$ und Weiter-Kultivierung über 3 h		2,6

3.7 Spektroskopische Befunde des *in vitro* synthetisierten cDPG

Für die Auswertung der NMR-Spektren des cDPG wurde folgende Indizierung der Protonen und Phosphate eingeführt (Abb. 20):

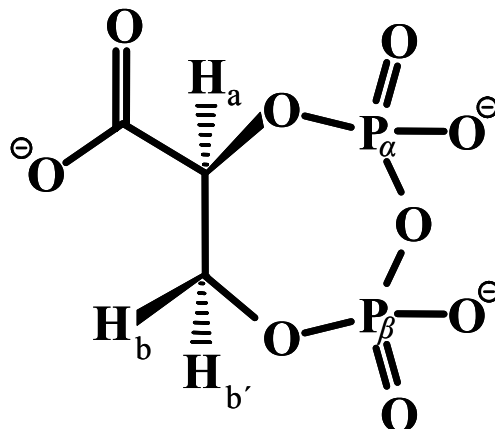


Abb. 20: Indizierung der Protonen und der Phosphate im cDPG.

Das ^1H -NMR Spektrum (Abb. 21) wird durch zwei charakteristische Multipletts bei einer chemischen Verschiebung im Bereich von $\delta = 4,19 - 37,4$ ppm (H_b , $\text{H}_{b'}$) und von $\delta = 4,79 - 4,85$ ppm (H_a) geprägt. Führt man eine ^{31}P -Entkopplung dieses Spektrums durch, so erhält man ein einfaches Protonenspektrum (Abb. 22), in dem die erwarteten Dubletts von Dubletts registriert werden und die jeweiligen Kopplungen eindeutig zugeordnet werden konnten.

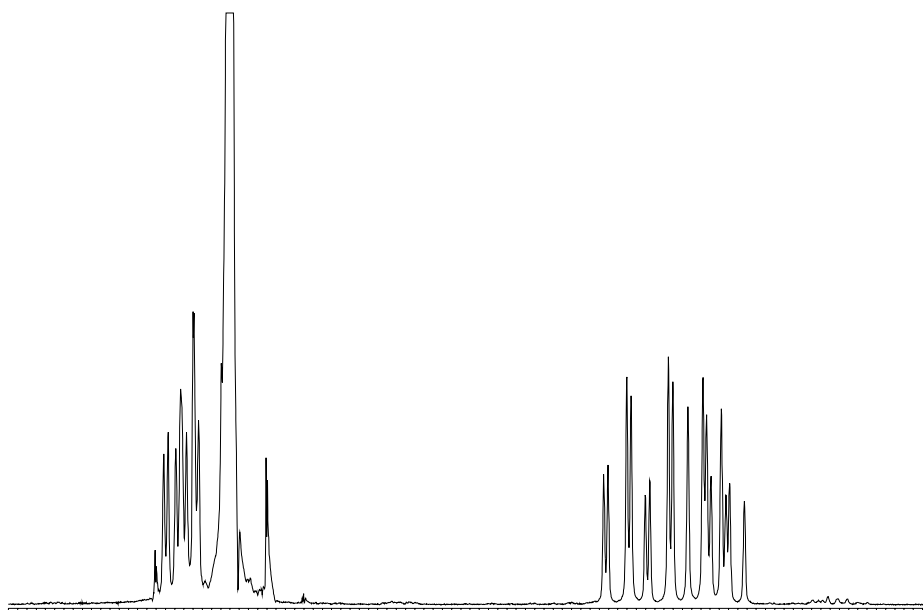


Abb. 21: ^1H -NMR von cDPG.

Für das Proton H_a wird eine Kopplungskonstante von $J = 10,0$ Hz für die axial, axiale Kopplung mit H_b und für die axial, äquatoriale Kopplung mit H_b eine Kopplungskonstante von $J = 2,2$ Hz registriert. Die bei höherem Feld befindlichen Signale der H_b -Protonen weisen einen deutlichen Dacheffekt auf, die 2J -Kopplungskonstante beträgt $J = 12,5$ Hz.

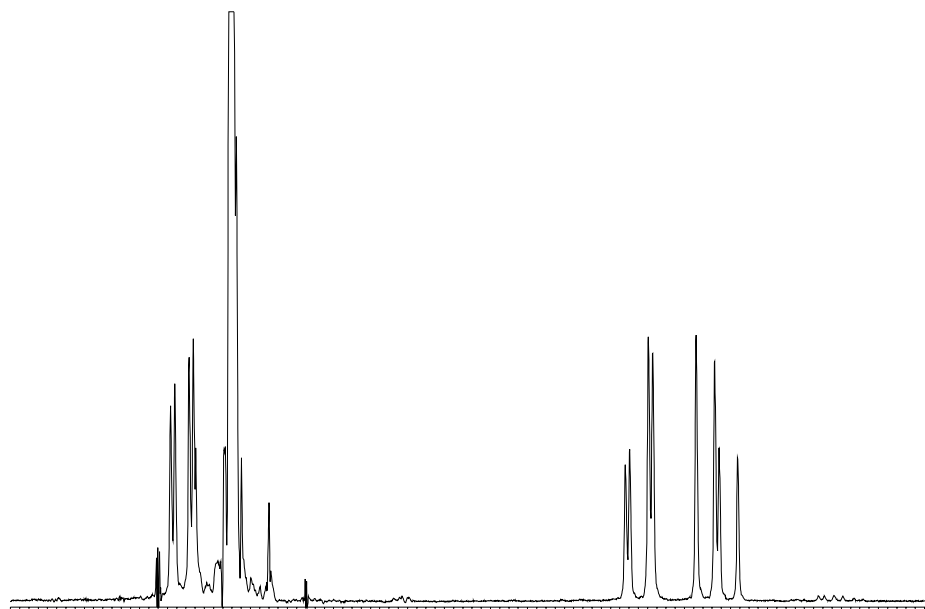


Abb. 22: ^{31}P -entkoppeltes ^1H -NMR von cDPG.

Wird der Entkoppler ausgeschaltet, so registriert man für das H_a -Proton durch die zusätzliche 3J -Kopplung mit dem P_α -Kern, die eine Konstante von $J = 6,5$ Hz aufweist, eine Aufspaltung des Signals bei $\delta = 4,81$ ppm in ein Dublett von Dubletts von Dubletts (ddd). Dabei kommt es zu einer Überlagerung der inneren Dubletts, so dass ein scheinbares Triplet ausgebildet wird. Für die beiden H_b -Protonen werden durch die Kopplungen mit dem P_β -Kern weitere Dubletts von Dubletts bei $\delta = 4,30$ ppm registriert sowie eine zusätzliche Signalaufspaltung (Multiplett) zwischen $\delta = 4,22$ und $\delta = 4,26$ ppm (Abb. 22).

Im ^1H -entkoppelten ^{31}P -NMR Spektrum (Abb. 23) wird für das cDPG bei $\delta = -10,5$ ppm (P_α) und bei $\delta = -9,2$ ppm (P_β) jeweils ein Dublett mit einer 2J -Kopplungskonstanten von $J = 181$ Hz registriert. Tritt eine Ringöffnung ein, so dass das DPG gebildet wird, findet durch den entschirmenden Effekt der Sauerstoffatome eine Tieffeld-Verschiebung der Signale um $\Delta\delta = 12,3$ ppm statt. Anstatt der Dubletts werden beim DPG die erwarteten Singulets bei $\delta = 2,2$ ppm und $\delta = 3,2$ ppm registriert.

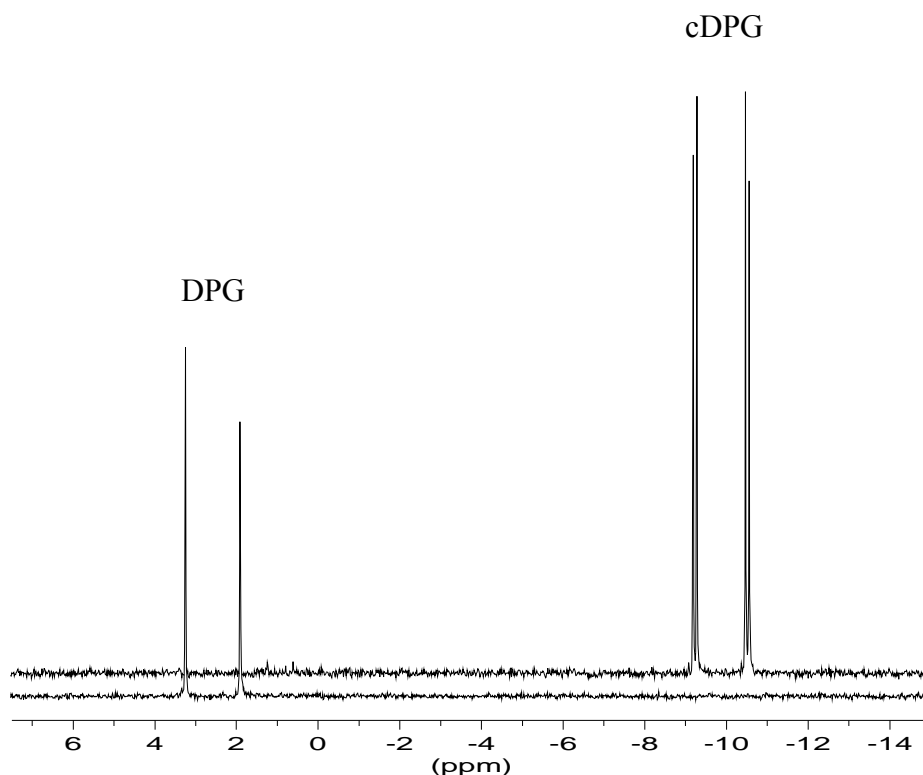


Abb. 23: ^{31}P -NMR von DPG und cDPG.

Die Zuordnung der Kohlenstoffsignale im ^{13}C -NMR (Abb. 24) ist aufgrund der entschirmenden Effekte der Sauerstoffatome eindeutig möglich. So ist die Carboxylgruppe des C-1 Kohlenstoffs am stärksten entschirmt und weist eine Verschiebung mit $\delta = 176,43$ ppm zu tiefem Feld auf. Der C-2 Kohlenstoff unterliegt einer schwächeren Entschirmung, so dass das Signal $\delta = 80,53$ ppm registriert wird. Für den C-3 Kohlenstoff ist die Entschirmung am niedrigsten. Dieses Signal wird bei $\delta = 72,02$ ppm gemessen. Die Signale des unter Verwendung rekombinanter cDPGS (Produktionsstamm: *E. coli* Mfe-cDPGS-MAP-pjf, s. Punkt 2.9.2) *in vitro* synthetisierten und isolierten Produktes stimmen mit aus *Mt. fervidus* gewonnenem cDPG überein.

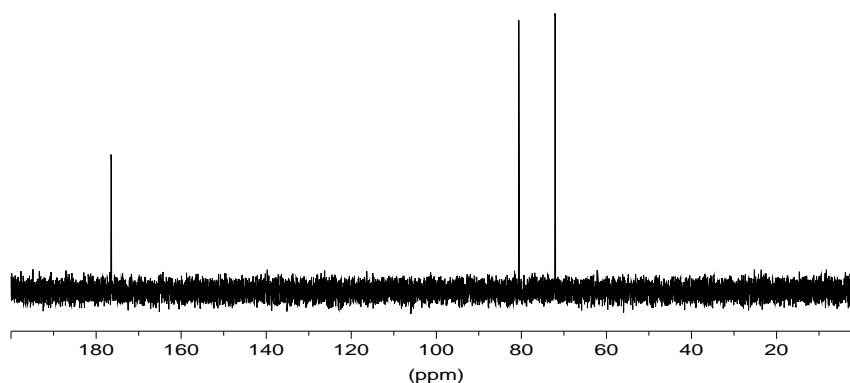


Abb. 24: ^{13}C -NMR von cDPG.

3.8 Ionenchromatographische Trennung der an der cDPG-Synthese beteiligten Verbindungen

Die Trennung der Verbindungen cDPG, DPG, ATP und ADP wurde mit einer AS11-Säule in Kombination mit einer AG11-Säule durchgeführt (Abb. 25). Die Detektion erfolgte über eine Leitfähigkeitsmesszelle; ein zwischengeschalteter Suppressor, der die Signale der Elutionsmittel chemisch verringert, erhöhte die Messsensitivität.

Zunächst wurde die Ausgangskonzentration der NaOH von 25 auf 50 mM linear innerhalb der ersten drei min verdoppelt. Danach wurde über einen Zeitraum von 5 min die Eluenten-Konzentration mit einem konkaven Elutionsprofil auf 37,5 mM erniedrigt und diese für 2 min const. gehalten. Anschließend wurde die Säule 3 min mit einer NaOH-Konzentration von 250 mM regeneriert. Die chromophoren Verbindungen ATP und ADP konnten zusätzlich zur Leitfähigkeit über Absorption bei 260 nm analysiert werden (Abb. 26).

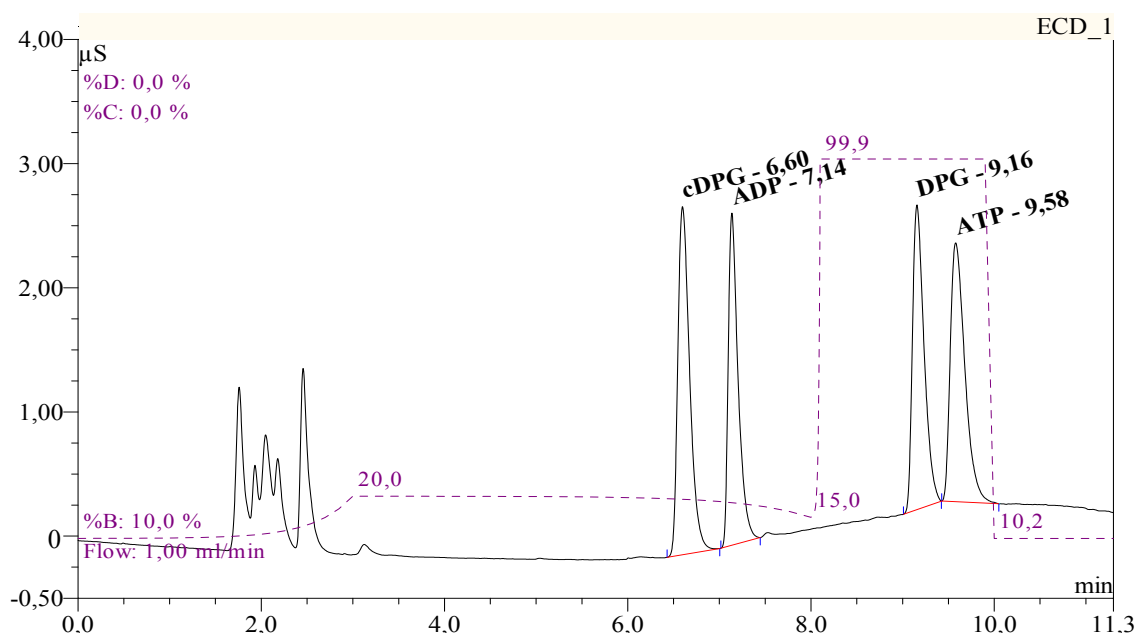


Abb. 25: Trennung der durch cDPGS umgesetzten Substanzen, Detektion über Leitfähigkeit. Die unterbrochene Linie entspricht dem Verlauf des NaOH-Gradienten.

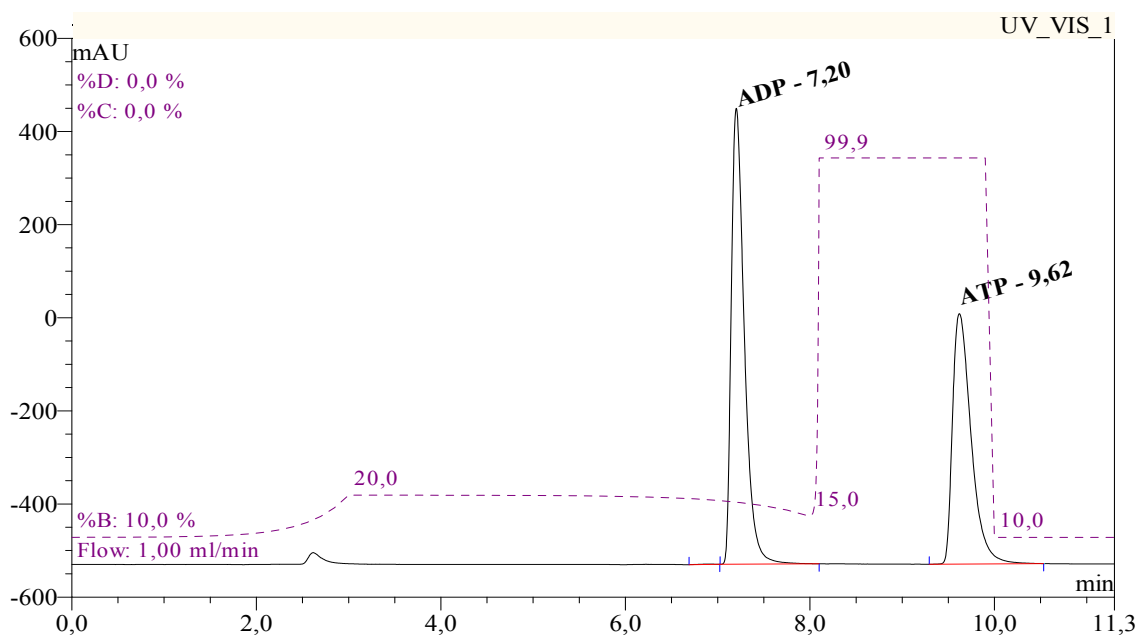


Abb. 26: Trennung der durch cDPGS umgesetzten Substanzen, Detektion über UV-Absorption. Die unterbrochene Linie entspricht dem Verlauf des NaOH-Gradienten.

3.9 Dünnschichtchromatographische Trennung der an der cDPG-Synthese beteiligten Verbindungen

Die bei Isolierung aus *Mt. fervidus* (s. Punkt 2.9.1) und während der *in vitro*-Synthese und enzymatischer Analyse von cDPG (s. Punkte 2.9.2 und 2.8.3) auftretenden Phosphatverbindungen konnten über Cellulose-Dünnschicht-Chromatographie getrennt werden. Die Detektion der verschiedenen Komponenten erfolgte über Reaktion mit Hanes-Reagenz. Anschließend wurden die R_f -Werte für die Verbindungen ermittelt (s. Tab. 11).

Tab. 11: R_f -Werte cDPG-Synthese relevanter Verbindungen

Verbindung	R_f -Wert
2-PG	0,33
ADP	0,31
3-PG	0,30
ATP	0,21
DPG	0,18
cDPG	0,14

4. Diskussion

4.1 cDPG, ein thermokompatibles Solut

In verschiedenen hyperthermophilen Organismen liegen negativ geladene organische Verbindungen in auffallend hohen Konzentrationen vor. Aufgrund vorliegender Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen (Hensel und König, 1988; Martins und Santos, 1995; Martins *et al.*, 1997; Scholz *et al.*, 1998; Lamosa *et al.*, 1998; Shima *et al.*, 1998; Argüelles, 2000; Welsh, 2000; Santos und da Costa, 2001; Borges *et al.*, 2002) kann vielen dieser Verbindungen eine hitzeprotektive Wirkung zugesprochen werden. Folgende Substanzen seien als Beispiele erwähnt: cDPG, DIP, Mannosylglycerat, Di-Glycerolphosphat, 2-O- β -Mannosyl-di-myo-Inositol-1,1'-Phosphat. Für ihre *in vivo*-Funktion als Thermo-Protektor spricht die Beobachtung, dass bei einer Erhöhung der Wachstumstemperatur der jeweiligen Organismen die intrazelluläre Konzentration der Substanzen ansteigt. Für Mannosylglycerat und Di-Glycerolphosphat lässt sich eine Akkumulation auch bei einer Erhöhung der Osmolarität des Mediums beobachten (Martins und Santos, 1995; Martins *et al.*, 1997).

Diese Arbeit befasst sich mit der Bedeutung von cDPG für die Thermo-Adaption von *Mt. fervidus*. Bislang konnte cDPG nur in methanogenen Organismen gefunden werden. In den vorliegenden Untersuchungen dieser Arbeit konnte die Substanz erstmalig auch in *Pyrococcus woesei* nachgewiesen werden, einem zwar euryarchaealen, jedoch nicht-methanogenen Organismus. Die Konzentration wurde mit $0,2 \mu\text{mol mg}^{-1}$ Prot. bestimmt und liegt damit in einer Größenordnung, die für die Konzentration von DIP, dem charakteristischen thermokompatiblen Solut für *P. woesei*, angegeben wird (Konzentration zwischen $0,1$ und $0,4 \mu\text{mol mg}^{-1}$ Prot.; Wolff, 2001). Aus dem Reich der Crenarchaea konnte bislang kein cDPG-positiver Organismus gefunden werden.

4.1.1 Wirkung von cDPG auf die Stabilität von Enzym-Proteinen

Die thermoprotektive Wirkung des Soluts auf die Stabilität verschiedener Enzym-Proteine insbesondere aus thermophilen Organismen konnte bei den vorliegenden Messungen bestätigt werden. Die Wirkung ist jedoch nicht auf Enzyme cDPG-positiver Organismen wie *Mt. fervidus* oder *P. woesei* beschränkt, sondern schließt auch Enzyme aus *Thermoproteus tenax*, einem cDPG-negativen Crenarchaeum, ein. So konnte GAPDH und GAPN von diesem Organismus in Gegenwart von 300 mM cDPG *in vitro* stabilisiert werden. Die Wirkung auf Enzyme von mesophilen Organismen ist hingegen sehr unterschiedlich: Untersuchungen mit mesophiler LDH, TIM und Eno (aus Kaninchenmuskel) zeigten, dass cDPG hier destabilisierend wirkt; dagegen wird CS aus Schweineherz mit cDPG (375 mM) stabilisiert. Ein aktivitätserhaltender Effekt wurde auch für GAPDH aus Kaninchenmuskel gefunden. Dieses Ergebnis steht scheinbar

im Gegensatz zu Untersuchungen von Hensel und König (1988), bei denen keinerlei positiver Effekt durch das niedermolekulare Solut erzielt werden konnte. Detailliertere Untersuchungen ergaben, dass die Wirkung des Solut auch von der Wahl des Puffers und zusätzlicher Komponenten abhängt. Während GAPDH mit 375 mM cDPG in 10 mM KPO₄ und 15 mM β -Mercapto-Ethanol bereits nach 20-minütiger Inkubation bei 50° C keine Aktivität mehr zeigt, stabilisiert die gleiche Konzentration des cDPG das Enzym in 50 mM HEPES-Puffer deutlich.

Über die zu Grunde liegenden Mechanismen der stabilisierenden Wirkung von cDPG und anderer thermokompatibler Solute wie beispielsweise DIP bestehen noch keine klaren Vorstellungen. Da gerade hohe Konzentrationen der entsprechenden Solute für ihre Wirkung erforderlich sind, gehen wir davon aus, dass eher indirekte als spezifische Interaktionen mit dem Protein für die beobachtbaren Effekte verantwortlich sind. Eine plausible Erklärung für diese Effekte gibt die maßgeblich von Arakawa und Timasheff (1983) formulierte Hypothese des "präferierten Ausschlusses", die die stabilisierende Wirkung niedermolekularer Komponenten mit deren Potential begründet, das jeweilige Protein aus der Lösung auszuschließen. Dieses Potential spiegelt sich im Vermögen der Komponenten wider, Proteine "auszusalzen", wie es aus der Hofmeister-Reihe (Hofmeister, 1888) abzuleiten ist. Interessanterweise ist die stabilisierende Wirkung von cDPG auf Proteine in vielen Fällen der des anorganischen Phosphates, dem Anion mit dem höchsten Aussalzeffekt, sehr ähnlich. Daraus könnte man schließen, dass die stabilisierende Wirkung dieses Solut im Wesentlichen auf seinen Phosphat-Anteil zurückzuführen ist.

Wie die teilweise sehr unterschiedliche Wirkung von cDPG auf die Stabilität von Enzym-Proteinen zeigt, müssen allerdings noch weitere Faktoren maßgeblich an dieser Interaktion beteiligt sein, die für die differenziellen Effekte verantwortlich sind. Es wäre naheliegend, dass die Protein-Struktur hier maßgeblichen Einfluss hat. Möglicherweise ist die bessere Stabilisierbarkeit von Enzymen aus (hyper-)thermophilen Organismen mit deren höherer Oberflächenladungsdichte zu begründen (Cambillau und Claverie, 2000), die den Ausschluss-Effekt der Solute unterstützt.

4.1.2 Temperatur-Abhängigkeit der cDPG-Akkumulation

Bisher durchgeführte Untersuchungen zeigen erstens, dass die intrazelluläre Konzentration von cDPG in thermophilen Organismen mit steigendem Temperatur-Optimum zunimmt (Hensel und König, 1988; Kurr *et al.*, 1991). So wurden in *Mt. fervidus*, *Mt. sociabilis* und *Mp. kandleri* (optimale Wachstumstemperaturen: 83, 88 und 98° C) Konzentrationen von jeweils 300, 320 und 600 mM intrazellulärem cDPG³⁻ ermittelt. Zweitens steigt bei den hyperthermophilen *Mt. fervidus* und *Mt. sociabilis* bei Erhöhung der Anzucht-Temperatur die cDPG-Konzentration bis zum Erreichen des Temperatur-Optimums. Beide Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass cDPG eine wichtige Rolle in der Thermo-Adaption hyperthermophiler Methanogener spielt. Demgegenüber scheint cDPG im moderat thermophilen *Mb. thermautotrophicus* (optimale

Wachstumstemp.: 65° C) eine andere Funktion zu übernehmen: So liegt der cDPG-Gehalt dieses Organismus unter dem des mesophilen *Methanobacterium bryantii* (optimale Wachstumstemp.: 37° C) und auch eine Erhöhung der Anzucht-Temperatur wird nicht durch Erhöhung der cDPG-Konzentration beantwortet. Allerdings wird bei höherer Wachstumstemperatur eine Zunahme der K⁺-Konzentration beobachtet, die auch eine entsprechende Erhöhung der Anionen-Konzentration in der Zelle erwarten lässt. An dieser Anionen-Konzentrationserhöhung ist möglicherweise Glutamat und/oder 1,3,4,6-Hexantetracarboxylsäure beteiligt (Gorkovenko *et al.*, 1994), sicher nicht jedoch cDPG. Untersuchungen von van Alebeek *et al.* (1991 und 1994b) und Sastry *et al.* (1992), die zeigen, dass die cDPG-Hydrolyse in *Mb. thermoautotrophicus* nicht durch die cDPGS, sondern durch cDPG-Hydrolasen katalysiert wird, die durch Phosphat reguliert werden, lassen die Vermutung zu, dass in diesem Organismus cDPG eher eine Funktion als Phosphatspeicher erfüllt.

Um unsere Vorstellung über die Funktion von cDPG in *Mt. fervidus* als Thermo-Adaptor weiter abzusichern, und um Einblicke in die Mechanismen der temperaturabhängigen Änderungen des cDPG-Pools in der Zelle zu erhalten, wurden Temperatur-Umstellungsversuche mit *Mt. fervidus*-Kulturen durchgeführt und die zeitabhängige Veränderung der intrazellulären cDPG-Konzentration verfolgt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen bestätigen im Wesentlichen die Experimente von Hensel und König (1988), die mit *Mt. fervidus*-Kulturen durchgeführt wurden, welche bei verschiedenen, aber konstanten Temperaturen gezogen wurden: Höhere Temperaturen bedingen eine höhere intrazelluläre cDPG-Konzentration, tiefere Temperaturen eine niedrigere cDPG-Konzentration. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lieferten jedoch weitere wichtige Informationen: Die Temperatur-Umstellungsversuche zeigen, dass zumindest über einen relativ kurzen Zeitbereich nach der Umstellung die cDPG-Konzentration auch über das Temperatur-Optimum hinaus (auf 93° C) deutlich ansteigt. cDPG-Bestimmungen an Kulturen, die bei konstanten Temperaturen angezogen wurden, zeigten zwar auch eine Erhöhung der cDPG-Konzentration bis zur optimalen Wachstumstemperatur, bei Temperaturen über dem Optimum war dagegen eine Erniedrigung der cDPG-Konzentration festzustellen (Hensel und König, 1988). Dieser Befund könnte darauf hindeuten, dass bei einer längerfristigen Anpassung an superoptimale Temperaturen zusätzliche Faktoren wirksam werden, die eine Reduktion der cDPG-Konzentration erlauben. Wie die beschriebenen Versuche weiter zeigen, erfolgt die Einstellung auf das "neue" Konzentrations-Niveau - nach Erhöhung oder Erniedrigung der Temperatur - in Zellen der logarithmischen und der stationären Wachstumsphase vergleichbar schnell. Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass die Einstellung des cDPG-Niveaus eher auf Protein-Ebene als auf Genebene reguliert wird. Bei einer Regulation auf Genebene würde man eine Einflussnahme des physiologischen Zustandes der Zelle und damit Unterschiede in der Reaktion von Zellen der logarithmischen und der stationären Phase erwarten.

4.2 cDPGS, der zentrale Schalter der cDPG vermittelten Thermo-Adaption in *Mt. fervidus*?

Bisher sind nur in wenigen Fällen die molekularen Hintergründe von temperaturbedingter Regulation bekannt. Es folgt eine kurze Erläuterung von Beispielen, bei denen diese Zusammenhänge bereits näher beleuchtet wurden:

So stellten Dietz und Somero (1992) ein Modell vor, in dem die Hauptrolle in der temperaturbedingten Regulation ein Hitzeschock-Faktor (HSF) spielt, der - abhängig von seiner Konformation - mit einem Hitzeschock-Element (HSE) interagiert. Dieses HSE ist vor Hitzeschock-Proteine codierenden Genen lokalisiert und fungiert als Regulator. Die Bindung mit HSE kann HSF nur nach vorheriger Bildung eines Trimers eingehen. Es wird angenommen, dass die Bildung des Trimers eine temperaturabhängige Konformationsänderung voraussetzt; diese Trimerisierung soll ein Hitzeschock-Protein HSP verhindern. Nach Hitzeschock führt die Zunahme teilweise entfalteter Proteine zu einer Austitrierung von HSP, so dass HSF trimerisieren und an HSE binden kann.

Nocker *et al.* (2001) konnten bei verschiedenen Rhizobien-Species eine temperaturgesteuerte Expression von Hitzeschock-Protein-Genen zeigen, die auf posttranskriptionaler Ebene durch Konformationsveränderung von mRNA beeinflusst wird. Bei normaler Wachstumstemperatur von 30° C wird eine Bindung von Ribosomen verhindert, indem die mRNA Sekundärstrukturen bildet, in denen das Startcodon und die Shine-Dalgarno-Sequenz integriert sind. Dies führt zu einer Repression der Strukturgene; die Ribosomen können - wie bei einigen Prokaryonten nachgewiesen (Carrier und Keasling, 1997) - keine protektive Wirkung auf die Nucleinsäure ausüben und die mRNA wird degradiert. Durch Erhöhung der Temperatur von 30° C auf 37° C wird die Sekundärstruktur aufgelöst, die Ribosomen-Untereinheiten können nun binden und die Translation der Hitzeschockgene findet statt. Ein ähnlicher temperaturbedingter Translationsregulationsmechanismus wurde von Morita *et al.* (1999a und 1999b) für *E. coli* beschrieben. Hier ist die Ribosomen-Bindestelle der mRNA des Transkriptionsfaktors σ^{32} von der Ausbildung einer entsprechenden Sekundärstruktur betroffen.

Ein zentraler Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Rolle der cDPGS, also dem Schlüsselenzym des cDPG-Stoffwechsels, in der temperaturabhängigen Veränderung des intrazellulären cDPG-Pools in *Mt. fervidus*. Die Resultate belegen, dass die Gegenwart dieses Enzymes Voraussetzung für die Synthese der niedermolekularen Substanz ist, da es bislang nur in cDPG-positiven Organismen detektiert werden konnte.

4.2.1 Makromolekulare Struktur und kinetische Eigenschaften der cDPGS aus *Mt. fervidus*-Zellen, die bei optimaler Wachstumstemperatur gezogen wurden

Bisherige Untersuchungen der cDPGS aus *Mt. fervidus* waren dadurch limitiert, dass dieses Enzym eine hohe Labilität bei geringen Ionenstärken und hohe Sensitivität gegen Oxidation aufweist. Um dieser Eigenschaft Rechnung zu tragen, wurde auf Grundlage der von Matussek (1996) verwendeten Aufreinigung eine verbesserte Aufreinigungsprozedur erarbeitet, bei der die beiden ersten Chromatographie-Schritte unter anaeroben Bedingungen und in Gegenwart relativ hoher KCl-Konzentrationen durchgeführt wurden. Dadurch gelang eine befriedigende Ausbeute aktiver cDPGS für weitergehende Experimente. Die Ergebnisse von Matussek (1996) wurden dahingehend bestätigt, dass unter denaturierenden Bedingungen in der SDS-PAGE zwei Banden für cDPGS detektiert wurden. Auch durch Variation der Aufreinigungsbedingungen wurde das Verhältnis beider cDPGS-Banden im Elektropherogramm nicht beeinflusst. Der Versuch, beide Protein-Species unter nativen Bedingungen durch Metallchelat- oder Ausschluss-Chromatographie voneinander zu trennen, scheiterte. Ein Edmann-Abbau ergab für beide Polypeptide eine identische N-terminale Aminosäure-Sequenz (s. Punkt 3.2.1); außerdem zeigte eine Southern Blot-Analyse mit genomischer DNS aus *Mt. fervidus* lediglich ein positives Signal. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass beide Isoformen von einem Gen codiert werden und die sichtbaren Differenzen auf Konformationsunterschieden oder chemischen Modifikationen beruhen. In der SDS-PAGE ließ sich ein apparentes Molekulargewicht von 57 000 und 59 000 (s. Abb. 9) ermitteln. Diese Werte weichen vom theoretischen MW von 50 657,1 deutlich ab. Ursache für diese reduzierte elektrophoretische Mobilität könnte eine anomale Interaktion mit der Gelmatrix sein, evtl. bedingt durch ein ungewöhnliches Auffaltungsverhalten des Proteins in Gegenwart von SDS. Ein vergleichbarer Fall wurde bereits für GAPDH aus *Mt. fervidus* beschrieben (Fabry und Hensel, 1988). Das Auftreten zweier Isoformen lässt sich durch chemische Modifikationen und/oder konformelle Unterschiede begründen. Zur Klärung dieser Problematik wurden mit dem Enzym massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt. Nach den Analysen zweier Labors (MPI Martinsried, AG Lottspeich und RUB, AG Meyer) konnte nur eine molekulare Masse ermittelt werden. Sie betrug $50\,663 \pm 6$ (AG Lottspeich) bzw. $50\,653 \pm 1$ (AG Meyer). Aus diesen Resultaten kann man schließen, dass es sich bei beiden im SDS-PAGE sichtbaren Banden der cDPGS um zwei Formen mit gleicher Masse handelt, die lediglich Unterschiede in der Konformation aufweisen oder dass die Differenzen zwischen den Formen so gering sind, dass sie mit Hilfe von Massenspektrometrie nicht aufgelöst werden können. Eine weitere Erklärung dieses Resultates könnte sein, dass nur eine der beiden Species einer massenspektrometrischen Analyse zugänglich ist. Dies wäre z.B. dann denkbar, wenn eine der beiden Formen so stark an der Vorsäule adsorbiert, dass sie unter den Analysebedingungen nicht eluiert und somit nicht detektiert werden kann.

Die bislang durchgeführten Versuche um (eine oder mehrere) chemische Modifikationen zu ermitteln (s. Punkt 3.5), schlugen fehl. Weitere Ansätze unter Verwendung hoher Konzentrationen reduzierender Agenzien (bis 10 mM DTT bzw. 25 % (v/v) β -Mercapto-

Ethanol), mit denen auch in unzugänglichen Bereichen des Enzymes befindliche Disulfidbrücken aufgespalten werden sollten (cDPGS enthält 8 Cysteine), zeigten keine Änderung in der anschließenden gel-elektrophoretischen Analyse. Auch Untersuchungen auf Glycosylierungen der cDPGS wurden durchgeführt, ohne ein positives Signal nach spezifischer Detektion zu zeigen. Um zu prüfen, ob nur eine konformelle Änderung Grund für die beobachtbare unterschiedliche elektrophoretische Mobilität sein könnte, wurde die Enzympräparation mit GuHCl und Harnstoff denaturiert. Die Behandlung führte zu einer Ausfällung und einer kompletten Inaktivierung des Enzymes. Bei einer im Anschluss an eine Dialyse zur Entfernung der denaturierenden Agenzien durchgeführten Gel-Elektrophorese ließ sich jedoch keine Änderung des Verhältnisses beider Banden zueinander erkennen.

Die aus SDS-PAGE abgeleitete Molekulargewichtsdifferenz von 2 000 zwischen beiden Protein-Species deutet auf eine größere Modifikation hin, die bei den beschriebenen Versuchen zur Detektion einer Phosphorylierung, ADP-Ribosylierung oder Glycosylierung nicht nachgewiesen werden konnte. Insbesondere hochsensitive massenspektrometrische Analysen hätten eine Modifikation dieser Größenordnung erfassen sollen. Daher vermuten wir eine eher kleinere Modifikation, die zu einer Auffaltung im modifizierten Molekül führt, welches im Gel ein retardiertes Migrationsverhalten zeigt. Eine dafür in Frage kommende Modifikation wäre eine Deamidierung einer oder mehrerer Aminosäuren, wie sie für andere Proteine bereits beschrieben ist (Bischoff und Kolbe, 1994). Hierbei werden die Amidgruppen von Asparagin und Glutamin unter Bildung von Aspartat und Glutamat zu Säuregruppen hydrolysiert. Deamidierungen treten bevorzugt bei hohen Temperaturen auf und führen nur zu einer Änderung des Molekulargewichts um 1 pro jeweiliger Modifikation. Eine so geringe Molekulargewichtsdifferenz könnte durch die massenspektrometrischen Analysen nicht erfasst werden. Ein weiterer Hinweis, der diese Theorie unterstützt, wurde durch Experimente mit rekombinantem Enzym gewonnen: Hierbei konnte *in vitro* durch Inkubation des Enzymes bei 93° C eine neue Protein-Species erzeugt werden, die im Elektropherogramm und in Western Blot-Analysen in der Laufhöhe der oberen der beiden Banden des Enzymes aus *Mt. fervidus* entspricht (vgl. Abb. 12 und Abb. 17).

In einem weiteren Ansatz wurden gelelektrophoretisch getrennte und gefärbte Banden ausgeschnitten, zerrieben und erneut einer Gel-Elektrophorese unterzogen. Nach anschließender Silber-Färbung ergibt die schneller wandernde Protein-Species nur eine Bande, die in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit der ursprünglichen Bande entspricht. Dagegen zeigte sich bei den Gelstücken der oberen Banden - neben dem zu erwartenden Signal der oberen Bande - auch die Entstehung einer neuen Protein-Species, die zwischen der oberen und der unteren Bande liegt. Eine Erklärung dafür wäre, dass diese Bande bei der Färbung des Gels mit Coomassie Blue entsteht, d.h. bei der Inkubation bei 50° C und pH = 3,0. Auch diese Beobachtung wäre mit der Annahme kompatibel, dass die geringe elektrophoretische Mobilität der oberen Bande auf eine Deamidierung zurückzuführen ist. So könnte(n) der (die) durch Deamidierung entstandene(n) "neue(n)" Asp-Rest(e) durch die Inkubation bei 50° C und pH = 3,0 im Verlauf der Coomassie-

Färbung eine Fragmentierung der Protein-Kette veranlassen. Wie von Wright (1991) beschrieben, finden hydrolytische Reaktionen präferiert bei sauren pH-Werten statt.

Die cDPGS aus *Mt. fervidus* zeigt klassische Michaelis-Menten-Kinetiken mit Substrat und Co-Substrat. Homotrope Effekte konnten nicht festgestellt werden. Bei den Messungen ist eine klare Bevorzugung der Reaktion in Richtung cDPG-Synthese zu verzeichnen: Substrat-Affinität und die V_{\max} -Werte liegen hierbei um den Faktor 8 bis 10 höher als die entsprechenden Werte für die umgekehrte Richtung (s. Tab. 5). Eine cDPG-Hydrolyse kann lediglich in Gegenwart von ADP und P_i gemessen werden, was auf die Reversibilität der Reaktion hinweist. In älteren Messungen (Lehmacher *et al.*, 1990a) konnte die Rückreaktion nicht gemessen werden, was auf den Einsatz von hemmend wirkendem HEPES (statt TES bei den Messungen in dieser Arbeit) als Puffersubstanz zurückzuführen ist. Eine cDPG-Hydrolase-Aktivität, wie sie in *Mb. thermotrophicus* gefunden wurde (Sastry *et al.*, 1992; van Alebeek *et al.*, 1994a), konnte in *Mt. fervidus*-Roh-Extrakten bislang nicht nachgewiesen werden. Die Messwerte wurden, im Gegensatz zu bisherigen Arbeiten (Lehmacher *et al.*, 1990a; Matussek, 1996), bei der optimalen Wachstumstemperatur von 83° C ermittelt. Um das intrazelluläre Ionen-Milieu des Organismus zu imitieren, wurden die Messungen in Gegenwart von 875 mM KCl durchgeführt.

4.2.2 Makromolekulare Struktur und kinetische Eigenschaften der rekombinanten cDPGS

Zur biochemischen Charakterisierung und zur Antikörper-Produktion wurde das cDPGS-Gen im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) exprimiert (s. Punkt 3.3). Um eine vollständige Abspaltung des N-terminalen Methionylrestes zu gewährleisten, wurde das *cpgS*-Gen mit dem Methionin-Aminopeptidase- (*map*)-Gen coexprimiert. Ein Vergleich der spezifischen cDPGS-Aktivitäten von hitzegefällten Roh-Extrakten, die eine nur partiell prozessierte cDPGS exprimierten (Expression ohne zusätzliches *map*-Gen), ergab einen 3-fach höheren V_{\max} -Wert der cDPG-Synthese für das vollständig prozessierte Protein (Expression mit zusätzlichem *map*-Gen). Möglicherweise ist der N-Terminus des Enzymes direkt oder indirekt am aktiven Zentrum beteiligt.

Zur Ermittlung der kinetischen Eigenschaften wurde die rekombinante cDPGS analog zur cDPGS aus *Mt. fervidus* anaerob aufgereinigt (s. Punkt 2.10.1). Dagegen wurde eine verkürzte 2-stufige Reinigungsprozedur (bestehend aus Hitze-fällung und chromatographischer Aufreinigung über Reactive Green 19) zur Antikörper-Synthese und zur Ermittlung der makromolekularen Eigenschaften angewandt (s. Punkt 2.10.2). In Elektropherogrammen nach SDS-PAGE zeigte die rcDPGS, im Gegensatz zur cDPGS aus *Mt. fervidus*, welche stets eine Doppelbande aufwies, lediglich eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 57 000 (s. Abb. 9). In massenspektrometrischen Analysen erhielt man einen Wert von $50\,655 \pm 6$, der gut mit dem Wert für cDPGS aus *Mt. fervidus* ($50\,653 \pm 1$) und dem aus der Aminosäure-Sequenz ermittelten theoretischen Molekulargewicht ($50\,657,1$) übereinstimmt. Gelfiltrationsexperimente unter

nativen Bedingungen ergaben, analog zur cDPGS aus *Mt. fervidus* (s. Abb. 10), ein Molekulargewicht von 112 000 und deuten darauf hin, dass auch das rekombinante Enzym ein Dimer bildet. Es ist nahe liegend, die Unterschiede im SDS-Gel-Elektropherogramm von rcDPGS und natürlicher cDPGS aus *Mt. fervidus* mit den unterschiedlichen Anzuchtbedingungen von *E. coli* und *Mt. fervidus* (bezüglich Temperatur, O₂-Gehalt der Kultur) und/oder mit der unterschiedlichen Enzymausrüstung beider Organismen zu begründen, die an einer evtl. Modifikation der cDPGS beteiligt sein könnte.

Da rcDPGS-Präparationen aus anaerob angezogenen *E. coli*-Kulturen wie entsprechende Präparationen aus aerob gezogenen *E. coli*-Kulturen ebenfalls nur eine Bande im SDS-Gel zeigten, gehen wir davon aus, dass das Auftreten der beiden Isoformen nicht durch die Gegenwart oder Abwesenheit von O₂ bedingt ist. Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass cDPGS von *Mt. fervidus*, dialysiert gegen antioxidansfreien Puffer und anschließend aerob gelagert, zwar Aktivität einbüßt, jedoch in der Gel-Analyse das gleiche unveränderte Bandenmuster zeigt wie eine unter anaeroben Bedingungen gelagerte Kontrolle.

Andererseits könnten die unterschiedlichen Anzucht-Temperaturen von *Mt. fervidus* und *E. coli* durchaus auf die Enzymausprägung Einfluss nehmen. Denkbar wäre(n) eine (oder mehrere) Deamidierung(en) von Asn- oder Gln-Resten als Ursache für das Auftreten zweier Isoformen in *Mt. fervidus*. Da grundsätzlich zu erwarten ist, dass Deamidierungsreaktionen bei höheren Temperaturen bevorzugt ablaufen, wäre es vorstellbar, dass diese Reaktionen speziell bei *Mt. fervidus* auftreten. Eine Deamidierung führt zu einer theoretischen Massendifferenz von 1 Da und ist deswegen auch über Massenbestimmungen kaum erfassbar, könnte aber durch Bildung einer zusätzlichen negativen Ladung Veränderungen der Protein-Struktur bewirken, die die beobachtbaren Laufunterschiede im SDS-Gel begründen würden. Tatsächlich bewirken Inkubationen in Phosphatpuffer (10 und 100 mM (pH = 6,5)) über 5 bis 20 min bei 93° C die Bildung einer zweiten Bande im SDS-Gel, die bezüglich ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit der oberen Bande der cDPGS aus *Mt. fervidus* entspricht (vgl. Abb. 12 und 17). Bei längerer Inkubationsdauer wurde allerdings diese Bande - wahrscheinlich bedingt durch hydrolytische Reaktionen - zunehmend diffuser. Das Übergewicht dieser Hydrolysereaktionen könnte auch der Grund dafür sein, dass es unter den gewählten Bedingungen unmöglich war, die untere Bande komplett in die obere Bande zu überführen; stattdessen schien sich ein Gleichgewicht einzustellen, das bei visueller Analyse stets dem der Abb. 17 entsprach. Trotz der noch etwas unübersichtlichen Situation erscheint die Annahme, es handele sich bei der unteren Bande der cDPGS aus *Mt. fervidus* um eine nicht-modifizierte Form der cDPGS, bei der oberen, langsamer wandernden Bande um eine modifizierte Form des Enzymes, als sehr wahrscheinlich.

Die kinetischen Daten der rcDPGS sind mit denen der aus *Mt. fervidus* isolierten cDPGS - mit Ausnahme der V_{\max} -Werte für die Synthese-Richtung - vergleichbar (vgl. Tab. 5 und 7). Wie beschrieben, ist der V_{\max} -Wert des rekombinanten Enzymes nur halb so hoch wie der des aus *Mt. fervidus* isolierten Enzymes. Interessanterweise wird mit der thermisch behandelten rcDPGS eine Erhöhung der Syntheserate beobachtet (s. Punkt 3.5). Dies bestärkt den Verdacht, dass eine

thermogene Modifikation für die charakteristische phänotypische Ausprägung des in *Mt. fervidus* vorliegenden Enzymes (2 Banden im SDS-Gel, höhere spezifische Aktivität) verantwortlich ist.

4.2.3 Einfluss der Wachstumstemperatur auf die phänotypische Ausprägung der cDPGS aus *Mt. fervidus*

Ziel dieser Untersuchungen war es, den Einfluss der Temperatur auf die makromolekulare Ausprägung der cDPGS von *Mt. fervidus* sowie auf die funktionellen Eigenschaften dieses Enzymes zu erfassen. Während die makromolekulare Ausprägung - insbesondere das Verhältnis der beiden Isoformen der cDPGS - unmittelbar in den Roh-Extrakten der bei den jeweiligen Temperaturen gezogenen Zellen über spezifische Antikörper untersucht werden konnte, musste für die Analyse der funktionellen Eigenschaften das Enzym aus den Extrakten der unter den jeweiligen Bedingungen gezogenen Zellen gereinigt werden. Wie sich zeigen ließ, wies das verwendete Antiserum gegen die rekombinante cDPGS äquivalente Spezifität gegenüber beiden Isoformen der *Mt. fervidus*-cDPGS auf: Western Blot-Analysen mit gereinigten cDPGS-Präparationen aus *Mt. fervidus* zeigten das gleiche Bandenverhältnis beider Isoformen wie die Coomassie gefärbten Gel-Elektropherogramme. Damit scheint die Blot-Analyse nach Protein-Transfer und anschließender Antikörper-Detektion eine probate Methode für die Analyse des Isomeren-Verhältnisses in zellfreien Extrakten zu sein; Aufreinigungsartefakte, die im Verlauf einer Enzymreinigung auftreten, können damit vermieden werden.

Wie dargestellt, ergeben die Temperatur-Sprung-Experimente ($83^{\circ}\text{C} \rightarrow 68^{\circ}\text{C}$; $83^{\circ}\text{C} \rightarrow 93^{\circ}\text{C}$) bezüglich des cDPGS-Isomeren-Verhältnisses ein recht einheitliches Bild (s. Abb. 13). Sowohl in der logarithmischen als auch in der stationären Phase resultiert der Temperatur-Sprung zur höheren Temperatur in der Verstärkung der oberen Bande (Bande mit geringer elektrophoretischer Mobilität), der Temperatur-Sprung zur niedrigeren Temperatur führt dagegen zu einer deutlichen Dominanz der unteren Isoform (Bande mit höherer elektrophoretischer Mobilität): Ausgehend von einem durchschnittlichen Verhältnis beider Formen im Kontroll-Ansatz (gezogen bei optimaler Wachstumstemperatur von 83°C , geerntet in der logarithmischen Phase) mit 54:46 (Relation untere:obere Bande) verschiebt sich das Verhältnis auf 76:24 bei der Temperatur-Erniedrigung bzw. auf 34:66 bei einer Temperatur-Erhöhung. In beiden Fällen scheint die temperaturbedingte Veränderung des Isomerenverhältnisses nach ca. 9 h abgeschlossen zu sein, unabhängig von der Wachstumsphase, in der die Temperatur-Veränderung durchgeführt wurde. In beiden Fällen wird die temperaturbedingte Veränderung des Isomerenverhältnisses begleitet von einer Zu- bzw. Abnahme der intrazellulären cDPG-Konzentration, die sich im gleichen Zeitraum von ca. 9 h abspielt. So sinkt bei Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase die cDPG-Konzentration innerhalb dieser Zeitspanne nach Temperatur-Erniedrigung von $1,25\text{ }\mu\text{mol mg}^{-1}\text{ Prot.}$ auf $0,96\text{ }\mu\text{mol mg}^{-1}\text{ Prot.}$ ab, während bei der Temperatur-Erhöhung der cDPG-Gehalt von $1,23\text{ }\mu\text{mol mg}^{-1}\text{ Prot.}$ auf $1,54\text{ }\mu\text{mol mg}^{-1}\text{ Prot.}$ ansteigt (s. Abb. 5 und 6). Diese auffällige Parallelität zwischen der Veränderung des Isomeren-

verhältnisses und der intrazellulären cDPG-Konzentration weist auf einen offensichtlichen Zusammenhang zwischen der makromolekularen Ausprägung der cDPGS und der Veränderung des cDPG-Pools in der Zelle hin. Um zu prüfen, ob mit der unterschiedlichen makromolekularen Ausprägung auch Veränderungen der kinetischen Charakteristik verbunden sind, die die Rolle der cDPGS als Schalter der cDPG vermittelten Thermo-Adaption bestätigen, wurden die enzymatischen Eigenschaften der cDPGS aus Zellen, die bei 68° C und 93° C gezogen wurden, analysiert.

Die ermittelten kinetischen Daten entsprechen den Erwartungen (vgl. Tab. 5 und 8): Die Niedertemperatur-Variante (cDPGS aus log. Zellen, die bei 68° C über 24 h adaptiert wurden) weist in Synthese-Richtung einen um $\frac{1}{3}$ niedrigeren V_{\max} -Wert als die Kontroll-Präparation bei const. 83° C und damit einen 4-fach niedrigeren Wert als cDPGS der Hochtemperatur-Variante auf. Die Affinität zu DPG und ATP ist graduell niedriger als die des Kontrollenzymes. Bei cDPG-Hydrolyse zeigt diese Variante den höchsten V_{\max} -Wert aller untersuchten Enzym-Varianten, der um 25 % höher als der Kontrollwert und 2-fach höher als der der Hochtemperatur-Variante liegt. Zusätzlich weist diese Species eine höhere Affinität zu ADP und cDPG auf. Die Hochtemperatur-Variante (cDPGS aus logarithmischen Zellen, die bei 93° C über 24 h adaptiert wurden) zeigt in Synthese-Richtung einen 3-fach höheren V_{\max} -Wert bei einem etwas niedrigeren K_M -Wert für DPG und ATP als die Kontroll-Präparationen aus Zellen, die bei const. 83° C gezogen wurden. In cDPG-Hydrolyserichtung liegt der V_{\max} -Wert ca. $\frac{1}{3}$ niedriger als der Vergleichswert der Kontrolle, während die K_M -Werte leicht erhöht sind.

Insbesondere die Unterschiede der beiden Enzym-Varianten in den V_{\max} -Werten für die Synthese- und Hydrolyse-Reaktion unterstützen die Vorstellung, dass die Hochtemperatur-Variante spezifisch dem Zweck der Akkumulation von cDPG, die Niedertemperatur-Variante dem Zweck des cDPG-Abbaus dient.

Weiter sollte untersucht werden, inwieweit sich beide Enzym-Varianten in ihrem regulatorischen Potential unterscheiden, um weitere Hinweise auf ihre physiologische Bedeutung zu erhalten (s. Punkt 3.4.2). Das vorliegende Datenmaterial reicht noch nicht für eine endgültige Beurteilung der regulatorischen Fähigkeiten der Enzym-Varianten aus. Untersucht wurden die Wirkungen verschiedener Intermediate des Kohlenhydrat-Metabolismus sowie einiger Energie- und Redoxmetabolite auf die Umsatzgeschwindigkeit der Synthesereaktion bei halbsättigender Substrat- und Cosubstrat-Konzentration. Hoch- und Niedertemperatur-Variante zeigen sehr ähnliche Reaktivitäten auf die verschiedenen Komponenten. Unterschiede treten allenfalls im Ausmaß der beobachtbaren hemmenden bzw. aktivierenden Effekte auf. Beide Enzym-Varianten werden in ihrer Aktivität durch NADP⁺, NADPH, NADH oder R-5-P nicht beeinflusst. Demgegenüber hemmen die Hexosephosphate Fru-1-P, Fru-6-P, Glc-1-P, Glc-6-P sowie AMP die Aktivität der Hoch- und Niedertemperatur-Variante. Eine deutliche Aktivierung wird dagegen mit 3-PG, PEP und ADP beobachtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die cDPGS auch über den physiologischen Zustand der Zelle reguliert wird. So spricht die hemmende Wirkung von AMP bzw. die aktivierende Wirkung von ADP für eine Beeinflussung der cDPGS durch den Energiezustand der Zelle. Dies erscheint insofern nachvollziehbar, als die

cDPG-Biosynthese über den Energiezustand an die Zellbiosynthese gekoppelt wird - die ja ebenfalls vom Energiezustand abhängt - um eine ausreichend hohe cDPG-Konzentration während der Zellvermehrung aufrecht zu erhalten. Unter diesem Aspekt könnte auch die sehr überzeugende Förderung der enzymatischen Aktivität durch PEP interpretiert werden. PEP könnte dabei als intrazelluläres Signal für einen aktiven C-Metabolismus (vornehmlich im Sinne des Anabolismus) und/oder für einen hohen Energiezustand verstanden werden. Nicht auszuschließen ist, dass PEP ebenso wie 3-PG, das ebenfalls einen deutlich fördernden Einfluss zeigt, die cDPG-Biosynthese im Sinne einer Vorläufer-Aktivierung steigert. Die hemmende Wirkung der Hexosemonophosphate könnte darauf hindeuten, dass sie als mehr oder weniger direkte Produkte des Glycogen-Abbaus in der Methanogenen-Zelle einen gewissen C- und Energienotstand signalisieren, der keine oder nur eine geringe Zellteilungsaktivität zulässt und damit auch eine reduzierte cDPG-Biosynthese als ökonomisch sinnvoll erscheinen lässt.

4.3 Vorarbeiten zur biotechnischen Produktion von cDPG

Die nachgewiesenen Effekte von cDPG als Thermo-Stabilisator bieten einen biotechnischen Einsatz dieser Verbindung an. Als eine wesentliche Voraussetzung für seine technische Einsetzbarkeit galt es, ein effizientes Produktionsverfahren zu entwickeln. Die Grundlagen für zwei Produktionsverfahren wurden in dieser Arbeit gelegt:

- 1) enzymatische Synthese mit rekombinanter cDPGS *in vitro*
- 2) Synthese durch einen rekombinanten *E. coli*-Stamm, der die beiden aus *Mt. fervidus* stammenden Gene zur Expression von 2-PGK und cDPGS enthält

Für die enzymatische Synthese wurde ein Protokoll erarbeitet, das bei Einsatz von 1,25 mmol DPG und ATP unter Berücksichtigung der Temperatur-Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten eine Produktion von 0,45 mmol cDPG erlaubte. Die anschließende Aufarbeitung des Reaktionsansatzes über Q-Sepharose erbrachte 0,38 mmol cDPG.

Als Voraussetzung für die Strategie 2 wurden die Gene, die für die Enzyme der cDPG-Synthese codieren (*2pgk* und *cpgS*), in *E. coli* exprimiert. Wie gezeigt werden konnte, ist die Anwesenheit beider Enzyme in *E.coli* ausreichend, um cDPG zu synthetisieren. Im Verlauf dieser Arbeit wurde versucht, die intrazelluläre Konzentration an cDPG zu erhöhen. Die dabei ermittelten maximalen Werte von 8,8 (mit IPTG-Induktion) bzw 5,1 (ohne IPTG-Induktion) $\mu\text{mol cDPG mg}^{-1}$ Prot. bilden die Basis für weitere Optimierungsversuche.

5. Zusammenfassung

Die vorliegenden Untersuchungen befassten sich mit dem Themenkomplex der Temperatur-Anpassung von hyperthermophilen Organismen mit Hilfe thermokompatibler Solute. Gegenstand der Untersuchung war im Wesentlichen *Methanothermus fervidus*, ein hyperthermophiles Methanoarchaeum mit einem Wachstumsoptimum von 83° C, das hohe Konzentrationen von cyclischem 2,3-Diphosphoglycerat (cDPG) akkumuliert.

Die Untersuchungen sollten (i) einen Beitrag zur Verbreitung dieser ungewöhnlichen Verbindung bei hyperthermophilen Organismen leisten, (ii) über die Wirkung des Sutes als Thermostabilisator für Enzym-Proteine Einsicht gewähren, (iii) eine Analyse der Temperatur-Abhängigkeit der Akkumulation des Sutes geben, (iv) Einblick in den molekularen Mechanismus der temperaturgesteuerten cDPG-Akkumulation erlauben sowie (v) die Entwicklung eines Produktionsverfahrens für cDPG anstreben, das eine biotechnologische Anwendung dieser Verbindung ermöglicht.

(i) Bei den Untersuchungen wurde cDPG in dem hyperthermophilen heterotrophen *Pyrococcus woesei* nachgewiesen, wodurch zum ersten Mal das Vorkommen dieser Verbindung auch außerhalb des Verwandtschaftskreises der Methanoarchaea belegt werden konnte. Wie Vergleiche von Genomen verschiedener Prokaryonten zeigten, korreliert die cDPG-Produktion eines Organismus mit dem Vorliegen von Homologen des Gens, das in *Mt. fervidus* die cDPG-Synthetase (cDPGS) codiert. Damit ist dieses Enzym, das die ATP abhängige intramolekulare Phosphoanhydrid-Bindung von 2,3-Diphosphoglycerat schließt, offensichtlich generell spezifisch und damit indikativ für die cDPG-Synthese. Demgegenüber stellt das Vorliegen einer 2-Phosphoglyceratkinase, die über die Phosphorylierung von 2-Phosphoglycerat zu 2,3-Diphosphoglycerat das Substrat der cDPGS bildet, scheinbar eine zwar notwendige, jedoch nicht hinreichende Voraussetzung für die cDPG-Produktion dar.

(ii) cDPG scheint generell Enzyme aus hyperthermophilen Organismen gegen Thermo-Inaktivierung zu schützen, weitgehend unabhängig davon, ob die jeweiligen Enzym-Proteine aus Organismen stammen, die zur cDPG-Produktion befähigt sind oder nicht. Hingegen konnten bei Enzymen aus mesophilen Organismen nur in einigen Fällen Stabilisierungserfolge erzielt werden. Die Untersuchungen deuten daraufhin, dass die stabilisierende Wirkung von cDPG in erster Linie auf einem präferierten Ausschluss-Effekt beruht (Arakawa und Timasheff, 1983), wobei allerdings die Proteinstruktur über mehr oder weniger spezifische Wechselwirkungen mit dem Solut zusätzlich Einfluss auf die Stabilisierbarkeit zu nehmen scheint. Möglicherweise ist in der für hyperthermophile Proteine als charakteristisch erkannten höheren negativen Oberflächen-Ladungsdichte (Cambillau und Claverie, 2000) eine Ursache für ihre bessere Stabilisierbarkeit

zu sehen. Denkbar wäre ein höherer Ausschluss-Effekt bedingt durch eine stärkere Repulsion zwischen Oberflächen-Ladung des Proteins und der dreifach negativen Ladung des Solutes.

(iii) Temperatur-Umstellungsversuche mit *Mt. fervidus*-Kulturen in exponentieller und stationärer Wachstumsphase zeigten einen eindeutigen Temperatur-Einfluss auf die intrazelluläre cDPG-Konzentration: Temperatur-Erhöhung über das Wachstumsoptimum von 83° C hinaus (auf 93° C) erhöht die cDPG-Konzentration (1,59 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ Prot.), Erniedrigung auf 68° C reduziert die cDPG-Konzentration (0,93 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ Prot.). Die Konzentrationsumstellungen sind - unabhängig von der Wachstumsphase - ca. 9 h nach Temperatur-Änderung weitgehend abgeschlossen. Die Beobachtung, dass die Kinetik der Umstellung nicht vom physiologischen Zustand der Zelle beeinflusst wird, könnte darauf hindeuten, dass die Regulation des cDPG-Pools in erster Linie auf Protein-Ebene greift.

(iv) Eingehende Untersuchungen an der cDPGS, dem Schüsselenzym des cDPG-Metabolismus, erhärteten den Verdacht, dass dieses Enzym die zentrale Regulationsstelle für die temperaturgesteuerte Veränderung des cDPG-Pools in *Mt. fervidus* darstellt. Analysiert wurden die funktionellen und makromolekularen Eigenschaften sowohl der naturalen cDPGS, wie sie in *Mt. fervidus* bei verschiedenen Wachstumstemperaturen vorliegt, als auch des in *E. coli* heterolog exprimierten rekombinanten Enzymes. Antiseren gegen das rekombinante Enzym dienten zur Identifizierung der cDPGS in zellfreien Extrakten von *Mt. fervidus*.

Während sich das Molekulargewicht von natürlichem und rekombinantem Enzym unter nativen Bedingungen nicht unterscheidet (beide Enzyme bilden Dimere mit einem apparenten Molekulargewicht von 112 000), differieren beide Enzyme in SDS-Gel-Elektropherogrammen: Das rekombinante Enzym weist - wie erwartet - nur eine Proteinbande auf, während im Fall des natürlichen Enzyms zwei Banden sichtbar sind, da zusätzlich zu einer Bande, die die gleiche Migrationsgeschwindigkeit wie das rekombinante Enzym besitzt, eine langsamer wandernde Bande auftritt. Identische N-terminale Partial-Sequenzen und vergleichbare Reaktivität gegenüber den eingesetzten Antiseren weisen auf hohe strukturelle Übereinstimmung der beiden Proteinformen untereinander und mit dem rekombinanten Enzym hin.

Unter regulativen und funktionellen Gesichtspunkten bedeutungsvoll ist die Beobachtung, dass sich das Verhältnis beider Protein-Formen mit der Wachstumstemperatur des Organismus ändert: Bei höherer Temperatur überwiegt die obere Bande, bei niedrigerer Temperatur die untere. Verbunden damit ist eine Veränderung des enzymatischen Phänotyps: So kann bei der Niedertemperatur-Variante (Dominanz der unteren Bande) eine deutliche Förderung der cDPG-Hydrolyse, bei der Hochtemperatur-Variante (Dominanz der oberen Bande) eine deutliche Förderung der cDPG-Synthese-Aktivität festgestellt werden. Ein enger Bezug zu der temperaturregulierten Konzentrationsveränderung von cDPG wird durch die Beobachtung hergestellt, dass der Zeitverlauf der cDPG-Konzentrationsveränderung nach Temperatur-Umstellung nahezu parallel zur Veränderung des Verhältnisses beider Enzym-Isoformen verläuft.

Die Frage nach der (den) Modifikation(en), die für die temperaturbedingte Veränderung des Phänotyps der cDPGS in *Mt. fervidus* verantwortlich ist (sind), bleibt bislang unbeantwortet. Massenspektrometrische Untersuchungen lassen keine Unterschiede zwischen beiden Isoformen erkennen und liefern Werte, die mit der errechneten Masse des Proteins übereinstimmen (s. Punkt 3.5). Tests auf verschiedene chemische Modifikationen (ADP-Ribosylierung, Phosphorylierung, Glycosylierung) blieben ergebnislos. Derzeit gehen wir Hinweisen nach, die für Deamidierungsreaktionen als Ursache der beobachteten Effekte sprechen.

Vorläufige Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Aktivität der cDPGS zusätzlich durch den physiologischen Zustand der Zelle kontrolliert wird. So konnten für verschiedene Intermediate und Energie-Metabolite fördernde bzw. hemmende Einflüsse auf die cDPGS festgestellt werden. Nach den bisherigen Ergebnissen bestehen diesbezüglich keine qualitativen Unterschiede in der Regulationsfähigkeit der Hochtemperatur- und Niedertemperatur-Variante des Enzyms.

(v) Als Voraussetzung für einen eventuellen biotechnologischen Einsatz von cDPG kann ein enzymatisches *in vitro*-Verfahren mit rekombinanter cDPGS von *Mt. fervidus* sowie ein *in vivo*-Verfahren mit einem rekombinanten *E. coli*-Stamm als Produzenten, der die codierenden Gene für die 2-PGK und cDPGS von *Mt. fervidus* trägt, vorgeschlagen werden.

6. Literaturverzeichnis

- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* (25): 3389-3402
- Andrä S., Frey G., Jaenicke R., Stetter K.O.** (1998) The thermosome from *Methanopyrus kandleri* posses an NH_4^+ -dependent ATPase activity. *Eur. J. Biochem.* (255): 93-99
- Appel R.D., Bairoch A., Hochstrasser D.F.** (1994) A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server. *Trends Biochem. Sci.* (19): 258-260
- Arakawa T. und Timasheff S.N.** (1983) Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. *Arch. Biochem Biophys.* (224): 169-177
- Arakawa T. und Timasheff S.N.** (1985) The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys. J.* (47): 411-414
- Arakawa T., Bhat R., Timasheff S.N.** (1990) Preferential interactions determine protein solubility in three-component solutions: the MgCl_2 System. *Biochemistry* (29): 1914-1923
- Arakawa T., Bhat R., Timasheff S.N.** (1990) Why preferential hydration does not always stabilize the native structure of globular proteins. *Biochemistry* (29): 1924-1931
- Argüelles J.C.** (2000) Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch. Microbiol.* (174): 217-224
- Ben-Bassat A., Bauer K., Chang S.-Y., Myambo K., Boosman A., Chang S.** (1987) Processing of the initiation methionine from proteins: properties of the *Escherichia coli* methionine aminopeptidase and its gene structure. *J. Bacteriol.* (169): 751-757
- Bischoff R. und Kolbe H.V.J.** (1994) Deamidation of asparagine and glutamine residues in proteins and peptides: structural determinants and analytical methodology. *J. Chromatogr.* (662): 261-278

- Blöchl E., Rachel R., Burggraf S., Hafenbradl D., Jannasch H., Stetter K.O.** (1997) *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113° C. *Extremophiles* (1): 14-21
- Borges N., Ramos A., Raven N.D.H., Sharp R.J., Santos H.** (2002) Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzyme. *Extremophiles* (6): 209-216
- Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* (72): 248-254
- Brown A.D.** (1976) Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* (40): 803-846
- Bullock W.O., Fernandez J.M., Short J.M.** (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming rec A *Escherichia coli* strain with beta-glucosidase selection. *BioTechniques* (5): 376-379
- Bult C.J., White O., Olsen G.J., Zhou L., Fleischman R.D., Sutton G.G., Blake J.A., Fitzgerald L.M., Clayton R.A., Gocayne J.D., Kerlavage A.R., Dougherty B.A., Tomb J.F., Adams M.D., Reich C.I., Overbeek R., Kirkness E.F., Weinstock K.G., Merrick J.M., Glodek A., Scott J.L., Geohagen N.S., Venter J.C.** (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* (273): 1058-1073
- Burggraf S., Fricke H., Neuner A., Kristjansson J., Rouvier P., Mandelco L., Woese C.R., Stetter K.O.** (1990) *Methanococcus igneus* sp. nov., a hyperthermophilic methanogen from a shallow submarine hydrothermal system. *Syst. Appl. Microbiol.* (13): 263-269
- Cambillau C. und Claverie J.-M.** (2000) Structural and genomic correlates of hyperthermostability. *J. Biol. Chem.* (275): 32383-32386
- Carrier T.A. und Keasling J.D.** (1997) Mechanistic modeling of prokaryotic mRNA decay. *J. Theor. Biol.* (189): 195-209
- Ciulla R.A., Burggraf S., Stetter K.O., Roberts M.F.** (1994) Occurance and role of di-*myo*-inositol-1,1'-phosphate in *Methanococcus igneus*. *Appl. Environ. Microbiol.* (60): 3660-3664

- Ciulla R.A., Diaz M., Taylor B., Roberts M.F.** (1997) Organic osmolytes in aerobic bacteria from Mono Lake, an alkaline, moderately hypersaline environment. *Appl. Environ. Microbiol.* (63): 220-226
- Covey T.R., Bonner R.F., Shushan B.I., Henion J.** (1988) The determination of protein, oligonucleotide and peptide molecular weights by ion-spray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2): 249-256
- Csonka L.N.** (1981) Proline over-production results in enhanced osmotolerance in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* (182): 82-86
- da Costa M.S., Santos H., Galinski E.A.** (1998) An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* (61): 117-153
- de Rosa M. und Gambacorta A.** (1988) The lipids of Archaeobacteria. *Prog. Lipid Res.* (27): 153-175
- Dietz T.J. und Somero G.N.** (1992) The threshold induction temperature of the 90-kDa heat shock protein is subject to acclimatization in eurythermal goby fishes (genus *Gillichthys*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* (89): 3389-3393
- Eckerskorn C., Mewes W., Goretzki H., Lottspeich F.** (1988) A new siliconized-glass fiber as support for a new protein-chemical analysis of electroblotted proteins. *Eur. J. Biochem.* (176): 509-519
- Erauso G., Reysenbach A.-L., Godfroy A., Meunier J.-R., Crump B., Partensky F., Baross J.A., Marteinson V., Barbier G., Pace N.R., Prieur D.** (1993) *Pyrococcus abyssi*, sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.* (160): 338-349
- Evans J.N.S., Tolman C.J., Kanodia S., Roberts M.F.** (1985) 2,3-Cyclophosphoglycerate in methanogens: evidence by ^{13}C NMR spectroscopy for a role in carbohydrate metabolism. *Biochemistry* (24): 5693-5698
- Fabry S. und Hensel R.** (1988) Primary structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase deduced from the nucleotide sequence of the thermophilic archaeobacterium *Methanothermus fervidus*. *Gene* (64): 189-197

- Fairbairn D.J., Liu W., Schachtman D.P., Gomez-Gallego S., Day S.R., Teasdale R.D.** (2000) Characterisation of two distinct HKT1-like potassium transporters from *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Mol. Biol.* (43): 515-525
- Faraone-Mennella M.R., de Lucia F., de Maio A., Gambacorta A., Quesada P., de Rosa M., Nicolaus B., Farina B.** (1995) ADP-ribosylation reactions in *Sulfolobus solfataricus*, a thermoacidophilic archaeon. *Biochim. Biophys. Acta* (1246): 151-159
- Fiala G. und Stetter K.O.** (1986) *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of Marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100° C. *Arch. Microbiol.* (145): 56-61
- Fuchs T., Huber H., Teiner K., Burggraf S., Stetter K.O.** (1995) *Metallosphaera prunea* sp. nov., a novel metal-mobilizing, thermoacidophilic Archaeum, isolated from a uranium-mine in Germany. *System. Appl. Microbiol.* (18): 560-566
- Fürste J.P., Pansegrau W., Frank R., Blöcker H., Scholz P., Bagdasarian M., Lanka E.** (1986) Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range *tacP* expression vector. *Gene* (48): 119-131
- Galinski E.A., Pfeiffer H.P., Trüper H.G.** (1985) 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidine-carboxylic acid: a novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Eur. J. Biochem* (149): 135-139
- Görg A., Postel W., Günther S.** (1988) Two-dimensional electrophoresis. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* (9): 531-546
- Golyshina O.V., Pivovarova T.A., Karavaiko G.I., Kondrateva T.F., Moore E.R.B., Abraham W.R., Lünsdorf H., Timmis K.N., Yakimov M.M., Golyshin P.N.** (2000) *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the Archaea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (50): 997-1006
- González J.M., Masuchi Y., Robb F.T., Ammerman J.W., Maeder D.L., Yanagibayashi M., Tamaoka J., Kato C.** (1998) *Pyrococcus horikoshii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal vent at the Okinawa Trough. *Extremophiles* (2): 123-130

- Gorkovenko A. und Roberts M.F.** (1993) Cyclic 2,3-diphosphoglycerate as a component of a new branch in gluconeogenesis in *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH. J. Bacteriol. (175): 4087-4095
- Gorkovenko A., Roberts M.F., White R.H.** (1994) Identification, biosynthesis and function of 1,3,4,6-hexanetetracarboxylic acid in *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH. Appl. Environ. Microbiol. (60): 1249-1253
- Gorris L.G.M., Korteland J., Derksen R.J.A.M., van der Drift C., Vogels, G.D.** (1990) Quantification of cyclic 2,3-diphosphoglycerate from methanogenic bacteria by isotachopheresis. J. Chromatogr. (504): 421-428
- Hanahan D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. (166): 557-580
- Hanahan D., Jessee J., Bloom F.R.** (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. Methods Enzymol. (204): 63-113
- Hanes C.S.** (1932) Studies on plant amylases. I. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. Biochem. J. (26): 1406-1421
- Haney P.J., Badger J.H., Buldak G.L., Reich C.I., Woese C.R., Olsen G.J.** (1999) Thermal adaptation analyzed by comparison of protein sequences from mesophilic and extremophilic *Methanococcus* species. Proc. Natl. Acad. Sci. (96): 3578-3583
- Hensel R. und König H.** (1988) Thermoadaptation of methanogenic bacteria by intracellular ion concentration. FEMS Microbiol. Lett. (49): 75-79
- Hensel R., Jakob I., Scheer H., Lottspeich F.** (1992) Proteins from hyperthermophilic archaea: stability towards covalent modification of the peptide chain. Biochem. Soc. Symp. (58): 127-133
- Hensel R.** (1993) Proteins of extreme thermophiles. In Kates M. *et al.* (Eds.). The Biochemistry of Archaea (Archaeobacteria), Elsevier Science Publishers: 209-221
- Hensel R., May R., Moritz P., Wolff S., Schramm A.** (1998) Interactions of low molecular weight compounds with enzyme proteins. Second meeting on extremophiles as cell factories, Dublin. In the Framework of the biotech programme of the European Union: 64

- Hess D., Krüger K., Knappig A., Palm P., Hensel R.** (1995) Dimeric 3-phosphoglycerate kinases from hyperthermophilic Archaea: cloning, sequencing and expression of the 3-phosphoglycerate kinase gene of *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli* and characterization of the protein. Structural and functional comparison with the 3-phosphoglycerate kinase of *Methanothermus fervidus*. Eur. J. Biochem. (233): 227-237
- Hesse M., Meier H., Zeeh B.** (1991) Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 4., überarbeitete Auflage (Stuttgart, New York: Thieme Verlag)
- Heukeshoven J. und Dernick R.** (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. Electrophoresis (6): 103-112
- Hofmeister F.** (1888) Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. (24): 247-260
- Jones W.J., Leigh J.A., Mayer F., Woese C.R., Wolfe R.S.** (1983) *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. Arch. Microbiol. (136): 254-261
- Jungblut P., Eckerskorn C., Lottspeich F., Klose J.** (1990) Blotting efficiency investigated by using two-dimensional electrophoresis, hydrophobic membranes and proteins from different sources. Electrophoresis (11): 581-588
- Kamekura M. und Dyll-Smith M.L.** (1995) Taxonomy of the family *Halobacteriaceae* and the description of two new genera *Halorubrobacterium* and *Natrialba*. J. Gen. Appl. Microbiol. (41): 333-350
- Kandler O.** (1992) Where next with the archaeobacteria? Biochem. Soc. Symp. (58): 195-207
- Kandler O. und König H.** (1998) Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). Cell. Mol. Life Sci. (54): 305-308
- Kanodia S. und Roberts M.F.** (1983) Methanophosphagen: unique cyclic pyrophosphate isolated from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Proc. Natl. Acad. Sci. (80): 5217-5221

- Kawarabayasi Y., Sawada M., Horikawa H., Haikawa Y., Hino Y., Yamamoto S., Sekine M., Baba S., Kosugi H., Hosoyama A., Nagai Y., Sakai M., Ogura K., Otsuka R., Nakazawa H., Takamiya M., Ohfuku Y., Funahashi T., Tanaka T., Kudoh Y., Yamazaki J., Kushida N., Oguchi A., Aoki K., Kikuchi H.** (1998) Complete sequence and gene organization of the genome of a hyperthermophilic archaebacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA Res.* (5): 55-76
- Kengen S.W.M., Stams A.J.M., de Vos W.M.** (1996) Sugar metabolism of hyperthermophiles. *FEMS Microbiol. Rev.* (18): 119-137
- Kleber-Janke T. und Becker W.-M.** (2000) Use of modified BL21(DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage. *Protein Expr. Purif.* (19): 419-424
- Krueger R.D., Harper S.H., Campell J.W., Fahrney D.E.** (1986a) Kinetics of phosphate uptake, growth, and accumulation of cyclic diphosphoglycerate in a phosphate-limited continuous culture of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Bacteriol.* (167): 49-56
- Krueger R.D., Seely R.J., Fahrney D.E.** (1986b) Intracellular K and cyclic diphosphoglycerate pools and transients in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Syst. Appl. Microbiol.* (7): 388-392
- Kurr M., Huber R., König H., Jannasch H.W., Fricke A., Trincone A., Kristjansson J.K., Stetter K.O.** (1991) *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov., represents a novel Group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110° C. *Arch. Microbiol.* (156): 239-247
- Laemmli U.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (227): 680-685
- Lamosa P., Martins L.O., da Costa M.S., Santos H.** (1998) Effects of temperature, salinity, and medium composition on compatible solute accumulation by *Thermococcus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* (64): 3591-3598
- Lamosa P., Burke A., Peist R., Huber R., Liu M.-Y., Silva G., Rodrigues-Pousada C., LeGall J., Maycock C., Santos H.** (2000) Thermostabilization of proteins by diglycerol phosphate, a new compatible solute from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* (66): 1974-1979

- Lauerer G., Kristjansson J.K., Langworthy T.A., König H., Stetter K.O. (1986)**
Methanothermus sociabilis sp. nov., a second species within the *Methanothermaceae* growing at 97° C. Syst. Appl. Microbiol. (8): 100-105
- Lehmacher A., Vogt A.-B., Hensel R. (1990a)** Biosynthesis of cyclic 2,3-diphosphoglycerate. Isolation and characterization of 2-phosphoglycerate kinase and cyclic 2,3-diphosphoglycerate synthetase from *Methanothermus fervidus*. FEBS Lett. (272): 94-98
- Lehmacher A. und Hensel R. (1990b)** Cyclic 2,3-diphosphoglycerate, protein stabilizer from thermophilic archaeobacteria: synthesis and function. DECHEMA Biotechnol. Conf. (4): 415-418
- Lehmacher A. und Hensel R. (1994)** Cloning, sequencing and expression of the gene encoding 2-phosphoglycerate kinase from *Methanothermus fervidus*. Mol. Gen. Genet. (242): 163-168
- Mamat B., Roth A., Grimm C., Ermler U., Tziatzios C., Schubert D., Thauer R.K., Shima S. (2002)** Crystal structures and enzymatic properties of three formyltransferases from archaea: environmental adaptation and evolutionary relationship. Protein Sci. (11): 2168-2178
- Martins L.O. und Santos H. (1995)** Accumulation of mannosylglycerate and di-*myo*-inositol-phosphate by *Pyrococcus woesei* in response to salinity and temperature. Appl. Environ. Microbiol. (61): 3299-3303
- Martins L.O., Carreto L.S., da Costa M.S., Santos H. (1996)** New compatible solutes related to di-*myo*-inositol phosphate in members of the order Thermotogales. J. Bacteriol. (178): 5644-5651
- Martins L.O., Huber R., Huber H., Stetter K.O., da Costa M.S., Santos H. (1997)** Organic solutes in hyperthermophilic Archaea. Appl. Environ. Microbiol. (63): 896-902
- Martinsson V.T., Birrien J.L., Reysenbach A.L., Vernet M., Marie D., Gambacorta A., Messner P., Sleytr U.B., Prieur D. (1999)** *Thermococcus barophilus* sp. nov., a new barophilic and hyperthermophilic archaeon isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. Int. J. Syst. Bacteriol. (49): 351-359

- Matussek K.** (1996) Untersuchungen zum intrazellulären ionischen Milieu von hyperthermophilen Archaea unter besonderer Berücksichtigung des Metabolismus des cyclischen 2,3-Diphosphoglycerats in *Methanothermus fervidus*.
Dissertation, Universität-GH Essen
- Matussek K., Moritz P., Brunner N., Eckerskorn C., Hensel R.** (1998) Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding cyclic 2,3-diphosphoglycerate synthetase, the key enzyme of cyclic 2,3-diphosphoglycerate metabolism in *Methanothermus fervidus*.
J. Bacteriol. (180): 5997-6004
- Meakin S. A., Nash J.H.E., Murray W.D., Kennedy K.J., Sprott G.D.** (1991) A generally applicable technique for the extraction of restrictable DNA from methanogenic bacteria.
J. Microbiol. Methods (14): 119-126
- Michaelis L. und Menten M.L.** (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung.
Biochem. Z. (49): 333-369
- Morita M., Kanemori M., Yanagi H., Yura T.** (1999a) Heat-induced synthesis of σ^{32} in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of *rpoh* mRNA secondary structure. J. Bacteriol. (181): 401-410
- Morita M., Tanaka Y., Kodama T.S., Kyogoku Y., Yanagi H., Yura T.** (1999b) Translational induction of heat shock transcription factor σ^{32} : evidence for a built-in RNA thermosensor. Genes Dev. (13): 655-665
- Mullis K.B., Faloona S., Scharf R., Saiki R.K., Horn G., Ehrlich H.** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology. (51): 263-273
- Mwatha W.E. und Grant W.D.** (1993): *Natronobacterium vacuolata* sp. nov., a haloalkiphilic archaeon isolated from lake Magadi, Kenya. Int. J. Syst. Bacteriol. (43): 401-404
- Nishimura N., Kitaura S., Mimura A., Takahara Y.** (1992) Cultivation of thermophilic methanogen KN-15 on H₂-CO₂ under pressurized conditions.
J. Ferment. Bioeng. (73): 477-480
- Nocker A., Hausherr T., Balsinger S., Krstulovic N.-P., Hennecke H., Narberhaus F.** (2001) A mRNA-based thermosensor controls expression of rhizobial heat shock genes.
Nucleic Acids Res. (29): 4800-4807

- Nunes O.C., Manaia C.M., da Costa M.S., Santos H.** (1995) Compatible solutes in the thermophilic bacteria *Rhodothermus marinus* and "*Thermus thermophilus*". Appl. Environ. Microbiol. (61): 2351-2357
- Pearson W.R., Lipman D.J.** (1988) Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Natl. Acad. Sci. (85): 2444-2448
- Ramakrishnan V., Verhagen M.F.J.M., Adams M.W.W.** (1997) Characterization of di-*myo*-inositol-1,1' phosphate in the hyperthermophilic *Thermotoga maritima*. Appl. Environ. Microbiol. (63): 347-350
- Ramos A., Raven N.D.H., Sharp R.J., Bartolucci S., Rossi M., Cannio R., Lebbink J., van der Oost J., de Vos W.M., Santos H.** (1997) Stabilization of enzymes against thermal stress and freeze-drying by mannosylglycerate. Appl. Environ. Microbiol. (63): 4020-4025
- Reeve J.N.** (1992) Molecular biology of methanogens. Annu. Rev. Microbiol. (46): 165-191
- Robb F.T., Maeder D.L., Brown J.R., DiRuggiero J., Stump M.D., Yeh R.K., Weiss R.B., Dunn D.M.** (2001) Genomic sequence of hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*: implications for physiology and enzymology. Methods Enzymol. (330): 134-157
- Robertson D.E. und Roberts M.F.** (1990) Organic osmolytes in methanogenic archaeobacteria. BioFactors (3): 1-9
- Rothschild L. J. und Mancinelli R.L.** (2001) Life in extreme environments. Nature (409): 1092-1101
- Rouvier P., Mandelco L., Winkler S., Woese C. R.** (1992) *Methanothermus fervidus* 16S ribosomal RNA. EMBL Nucleotide Sequence Database, Heidelberg, Germany
- Rudnick H., Hendrich S., Pilatus U., Blotevogel K.-H.** (1990) Phosphate accumulation and the occurrence of polyphosphates and cyclic 2,3-diphosphoglycerate in *Methanosarcina frisia*. Arch. Microbiol. (154): 584-588
- Ruepp A.** (1992) Untersuchungen zur Regulation der intrazellulären Konzentration von zyklischem 2,3-Diphosphoglycerat in *Methanothermus fervidus*. Diplomarbeit, Ludwigs-Maximilians-Universität, München

- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R.H., Horn G.T., Mullis K.B., Ehrlich H.A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable polymerase. *Science* (239): 487-490
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.** (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sandman K., Grayling R.A., Reeve J.N.** (1995) Improved N-terminal processing of recombinant proteins synthesized in *Escherichia coli*. *Biotechnology* (13): 504-506
- Santos H. und da Costa M.S.** (2001) Organic solutes from thermophiles and hyperthermophiles. *Methods Enzymol.* (334): 302-315
- Santos H. und da Costa M.S.** (2002) Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environ. Microbiol.* (4): 501-509
- Sastry M.V.K., Robertson D.E., Moynihan J.A., Roberts M.F.** (1992) Enzymatic Degradation of cyclic 2,3- Diphosphoglycerate in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biochemistry* (31): 2926-2935
- Schleper C., Pühler G., Klenk H.P., Zillig W.** (1996) *Picrophilus oshimae* and *Picrophilus torridus* fam. nov., gen. nov., sp. nov., two species of hyperacidophilic, thermophilic, heterotrophic, aerobic archaea. *Int. J. Syst. Bacteriol.* (46): 814-816
- Schramm A., Kohlhoff M., Hensel R.** (2001) Triose-phosphate isomerase from *Pyrococcus woesei* and *Methanothermus fervidus*. *Methods Enzymol.* (331): 62-77
- Scholz S., Sonnenbichler J., Schäfer W., Hensel R.** (1992) Di-myo-inositol-1,1'-phosphate: a new inositol phosphate isolated from *Pyrococcus woesei*. *FEBS Lett.* (306): 239-242
- Scholz S., Wolff S., Hensel R.** (1998) The biosynthesis pathway of di-myo-inositol-1,1'-phosphate in *Pyrococcus woesei*. *FEMS Microbiol. Lett.* (168): 37-42
- Seely R.J. und Fahrney D.E.** (1983) A novel diphospho-P,P'-diester from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Biol. Chem.* 258 (18): 10835-10838
- Seely R.J. und Fahrney D.E.** (1984) The cyclic-2,3-diphosphoglycerate from *Methanobacterium thermoautotrophicum* is a D enantiomer. *Curr. Microbiol.* (10): 85-88

- Shima S., Herault D.A., Berkessel A., Thauer R.K.** (1998) Activation and thermostabilizing effects of cyclic 2,3-diphosphoglycerate on enzymes from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri*. Arch. Microbiol. (170): 469-472
- Shima S., Thauer R.K., Ermler U., Durchschlag H., Tziatios C., Schubert D.** (2000) A mutation affecting the association equilibrium of formyltransferase from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri* and its influence on the enzyme's activity and thermostability. Eur. J. Biochem. (267): 6619-6623
- Shkedy-Vinkler C. und Avi-Dor Y.** (1975) Betaine-induced stimulation of respiration at high osmolarities in a halotolerant bacterium. Biochem. J. (150): 219-226
- Slesarev A.I., Mezhevaya K.V., Makarova K.S., Polushin N.N., Shcherbinina O.V., Shakhova V.V., Belova G.I., Aravind L., Natale D.A., Rogozin I.B., Tatusov R.L., Wolf Y.I., Stetter K.O., Malykh A.G., Koonin E.V., Kozyavkin S.A.** (2002) The complete genome of hyperthermophile *Methanopyrus kandleri* AV 19 and monophyly of archaeal methanogens. Proc. Natl. Acad. Sci. (99): 4644-4649
- Smith D.R., Doucette-Stamm L.A., Deloughery C., Lee H., Dubois J., Aldredge T., Bashirzadeh R., Blakely D., Cook R., Gilbert K., Harrison D., Hoang L., Keagle P., Lumm W., Pothier B., Qiu D., Spadafora R., Vicaire R., Wang Y., Wierzbowski J., Gibson R., Jiwani N., Caruso A., Bush D., Safer H., Patwell D., Prabhakar S., McDougall S., Shimer G., Goyal A., Pietrokovski S., Church G.M., Daniels C.J., Mao J., Rice P., Nölling J., Reeve J.N.** (1997) Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH: Functional analysis and comparative genomics. J. Bacteriol. (179): 7135-7155
- Soliman G.S.H. und Trüper H.G.** (1982) *Halobacterium pharaonis* sp. nov., a new, extremely haloalkiphilic archaebacterium with low magnesium requirement. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C (3): 318-329
- Somero G.N.** (1995) Proteins and temperature. Annu. Rev. Physiol. (57): 43-68
- Stetter K.O., Thomm M., Winter J., Wildgruber G., Huber H., Zillig W., Janekovic D., König H., Palm P., Wunderl S.** (1981) *Methanothermus fervidus*, sp. nov., a novel extremely thermophilic methanogen isolates from an Icelandic hot spring. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C. (2): 166-178
- Stetter K.O.** (1996) Hyperthermophilic procaryotes. FEMS Microbiol. Rev. (18): 149-158

- Stetter K.O.** (1999) Extremophiles and their adaptation to hot environments. FEBS Lett. (452): 22-25
- Studier B.W. und Moffat B.A.** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. (189): 113-130
- Szilagyi A. und Zavodszky P.** (2000) Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. Structure (8): 493-504
- Talarico L.A., Ingram L.O., Maupin-Furlow J.A.** (2001) Production of the gram-positive *Sarcina ventricula* pyruvate decarboxylase in *Escherichia coli*. Microbiology (147): 2425-2435
- Thein S.L. und Wallace R.B.** (1986) The use of synthetic oligonucleotides as a specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. Davis (Ed.), Human genetic diseases, a practical approach, IRL Press
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.** (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. (22): 4673-4680
- Timasheff S.N.** (1998) Control of protein stability and reactions by weakly interacting co-solvents: the simplicity of the complicated. Adv. Protein Chem. (51): 355-432
- Timasheff S.N.** (2002) Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. Proc. Natl. Acad. Sci. (99): 9721-9726
- Tindall B.J., Ross H.N.M., Grant W.D.** (1984) *Natronobacterium* gen. nov. and *Natronococcus* gen. nov., two new genera of haloalkaliphilic archaeobacteria. System. Appl. Microbiol. (5): 41-57
- Tolman C.J., Kanodia S., Roberts M.F., Daniels L.** (1986) ³¹P-NMR spectra of Methanogens: 2,3-cyclopyrophosphoglycerate is detectable only in methanobacteria strains. Biochim. Biophys. Acta (886): 345-352
- van Alebeek G.-J.W.M., Klassen C., Keltjens J.T., van der Drift C., Vogels G.D.** (1991) ATP synthesis from 2,3-diphosphoglycerate by crude extract of *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain deltaH). Arch. Microbiol. (162): 193-198

- van Alebeek G.-J.W.M., Hermans J.M.H., Keltjens J.T., Vogels G.D.** (1992) Quantification of intermediates involved in the cyclic 2,3-diphosphoglycerate metabolism of methanogenic bacteria by ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr.* (606): 65-71
- van Alebeek G.-J.W.M., Kreuwels M.J.J., Keltjens J.T., Vogels G.D.** (1994a) *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain deltaH) contains a membrane-bound cyclic 2,3-diphosphoglycerate hydrolase. *Arch. Microbiol.* (161): 514-520
- van Alebeek G.-J.W.M., Tafazzul G., Kreuwels M.J.J., Keltjens J.T., Vogels G.D.** (1994b) Cyclic 2,3-diphosphoglycerate metabolism in *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain deltaH): characterization of the synthetase reaction. *Arch. Microbiol.* (162): 193-198
- Vieille C. und Zeikus G.J.** (2001) Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (65): 1-43
- Wasserfallen A., Nölling J., Pfister P., Reeve J., Conway de Macario E.** (2000) Phylogenetic analysis of 18 thermophilic *Methanobacterium* isolates supports the proposals to create a new genus, *Methanothermobacter* gen. nov., and to reclassify several isolates in three species, *Methanothermobacter thermautotrophicus* comb. nov., *Methanothermobacter wolfeii* comb. nov. and *Methanothermobacter marburgensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (50): 43-53
- Weil C.F., Cram D.S., Sherf B.A., Reeve J.N.** (1988) Structure and comparative analysis of the genes encoding component C of methyl coenzyme M reductase in the extremely thermophilic archaeobacterium *Methanothermus fervidus*. *J. Bacteriol.* (170): 4718-4726
- Weiß J.** (1995) Ionenchromatographie. 2. Auflage, Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- Welsh D.T.** (2000) Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol. Rev.* (24): 263-290
- Whitman W.B.** (2001a) Genus II. *Methanotorris* gen. nov. In Boone D.R. *et al.* (Eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edn., vol. 1. Springer, New York: 245-246
- Whitman W.B.** (2001b) Genus I. *Methanocaldococcus* gen. nov. In Boone D.R. *et al.* (Eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edn., vol. 1. Springer, New York: 685-690

- Woese C.R. und Fox G.E.** (1977) Phylogenetic of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (74): 5088-5090
- Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L.** (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eukarya. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (87): 4576-4579
- Wolff S.** (2001) Die Biosynthese von Di-myo-inositol-1,1'-phosphat des hyperthermophilen Archaeums *Pyrococcus woesei*. Dissertation, Universität Essen
- Wright H. T.** (1991) Nonenzymatic deamidation of asparaganyl and glutamyl residues in proteins. *Crit. Rev. Biochem. Biol.* (26): 1-52
- Zillig W., Stetter K.O., Schäfer W., Janezovic D., Wunderl S., Holz I., Palm P.** (1981) *Thermoproteales*: a novel type of extremely thermoacidophilic anaerobic archaeobacteria isolated from icelandic solfatares. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C.* (2): 205-227
- Zillig W., Holz I., Klenk H.P., Trent J., Wunderl S., Janezovic D., Insel E., Haas B.** (1987) *Pyrococcus woesei*, sp. nov., an ultra-thermophilic marine archaeobacterium, representing a novel order, *Thermococcales*. *Syst. Appl. Microbiol.* (9): 62-70
- Zillig W.** (1991) Comparative biochemistry of Archaea and Bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev.* (1): 544-551
- Zwickl P., Fabry S., Bogedain C., Haas A., Hensel R.** (1990) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic Archaeobacterium *Pyrococcus woesei*: characterization of the enzyme, cloning and sequencing of the gene, and expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172 (8): 4329-4338

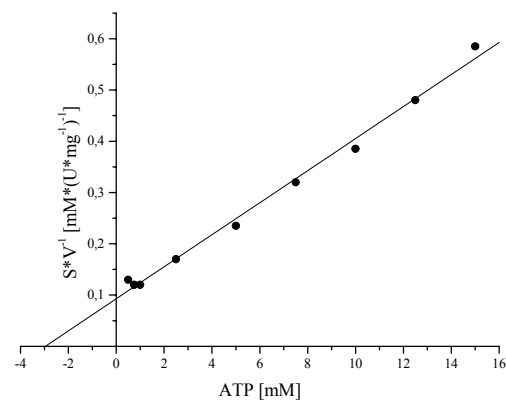
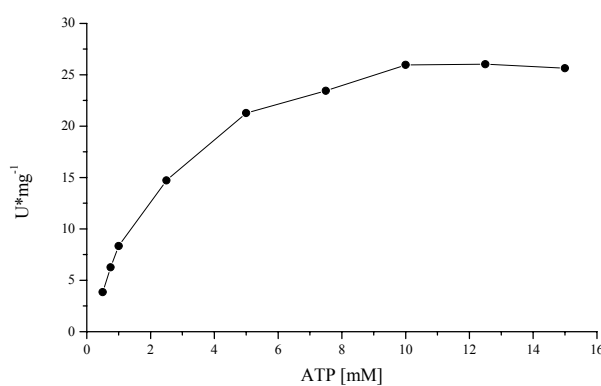
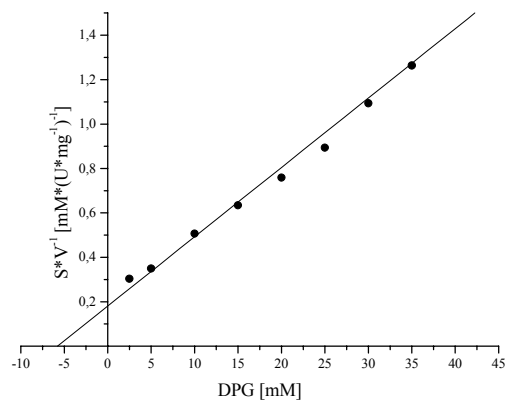
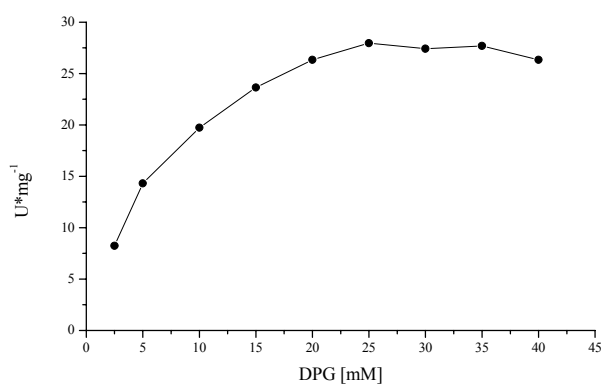
7. Anhang

7.1 Bestimmung der cDPGS-Substratsättigung

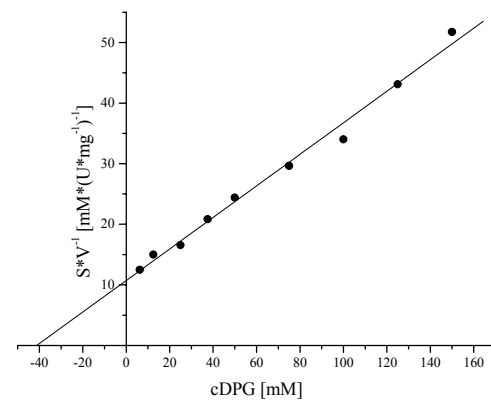
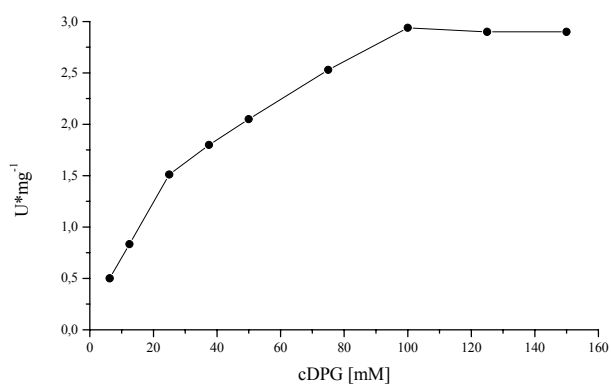
links: direkter Auftrag der Daten, rechts Transformation dieser Daten nach Hanes, 1932.

7.1.1 cDPGS aus *Mt. fervidus*-Zellen, die bei const. 83° C kultiviert wurden

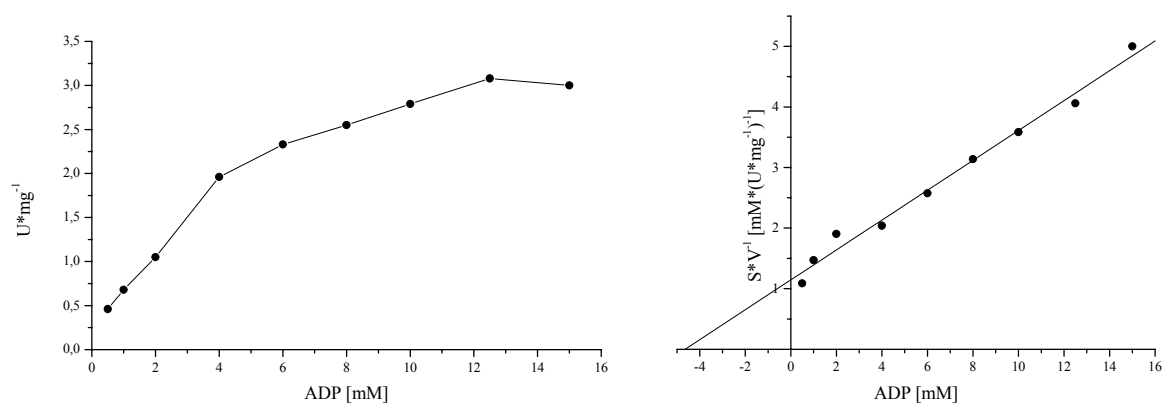
a) cDPG-Synthese-Richtung:



b) cDPG-Hydrolyse-Richtung:

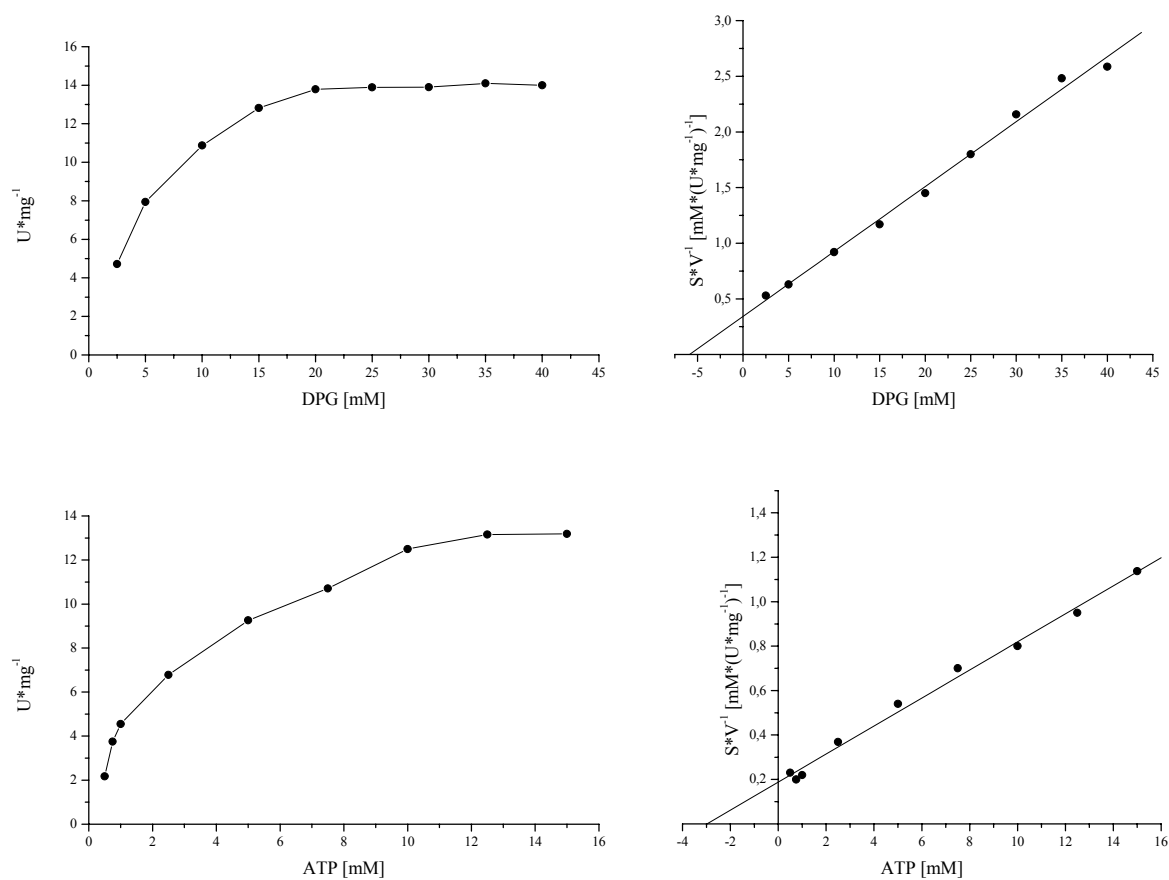


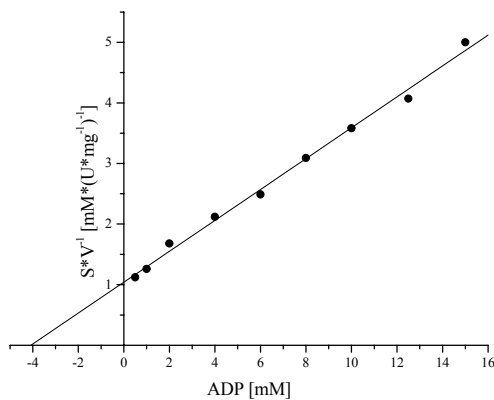
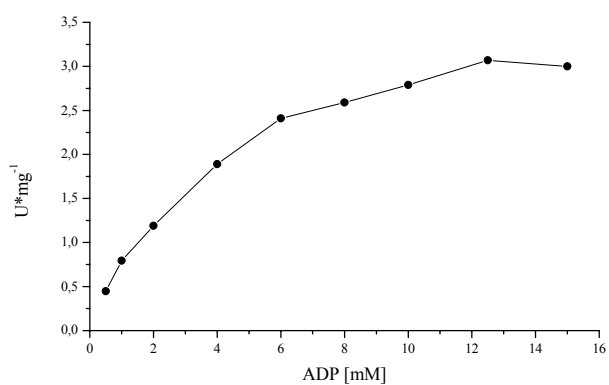
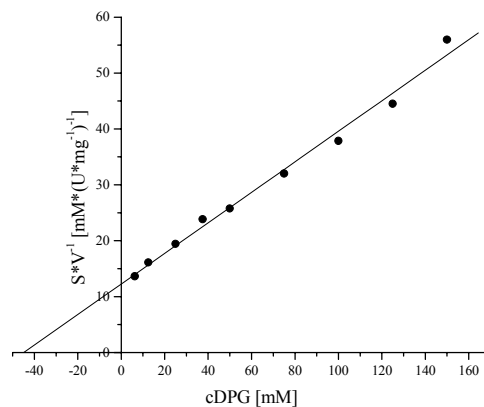
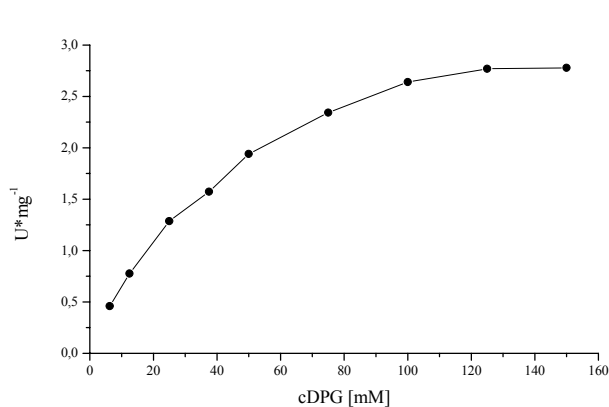
Fortsetz.: b) cDPG-Hydrolyse-Richtung (*Mt. fervidus* const. 83° C):



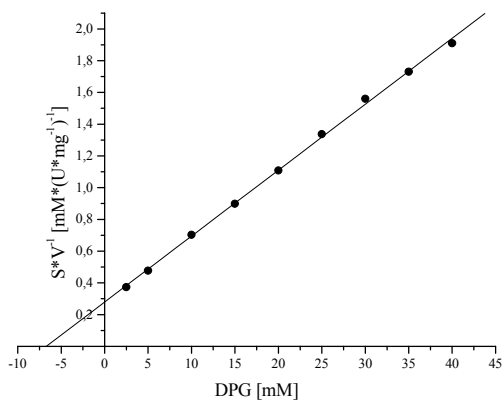
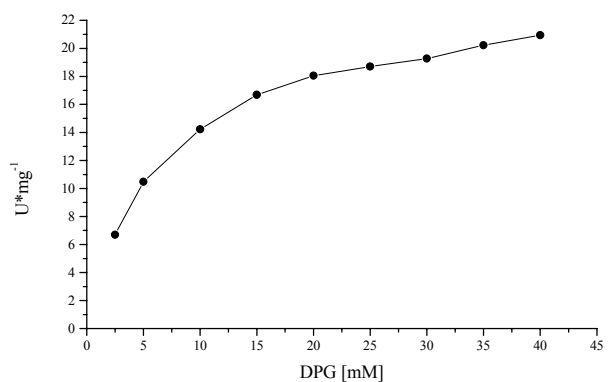
7.1.2 Rekombinante cDPGS aus *E. coli* Mfe-cDPGS-MAP-pjf

a) cDPG-Synthese-Richtung:

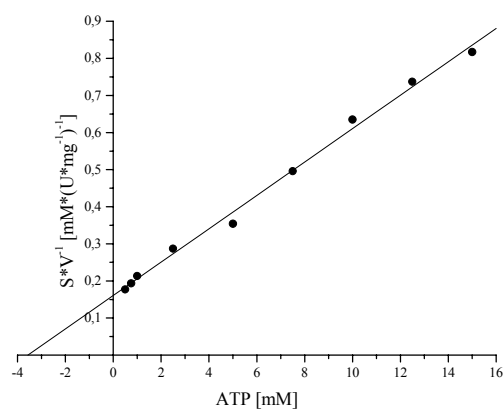
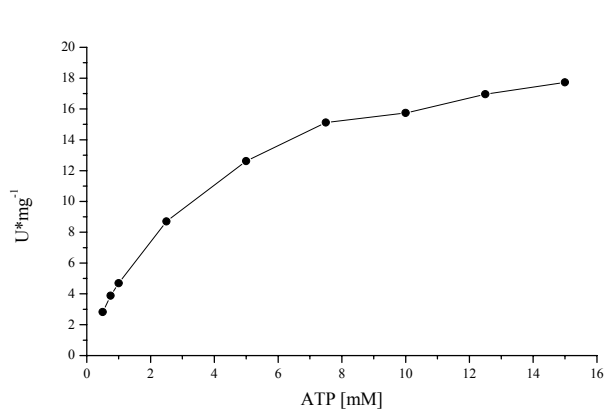


b) cDPG-Hydrolyse-Richtung:

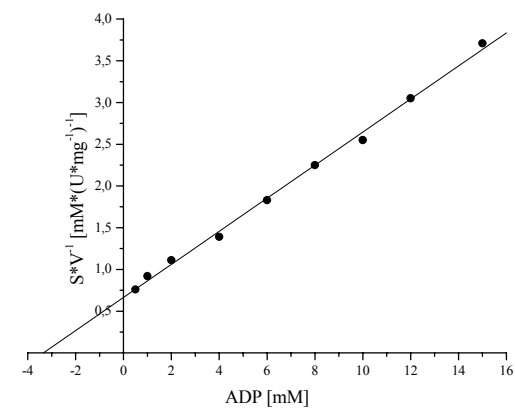
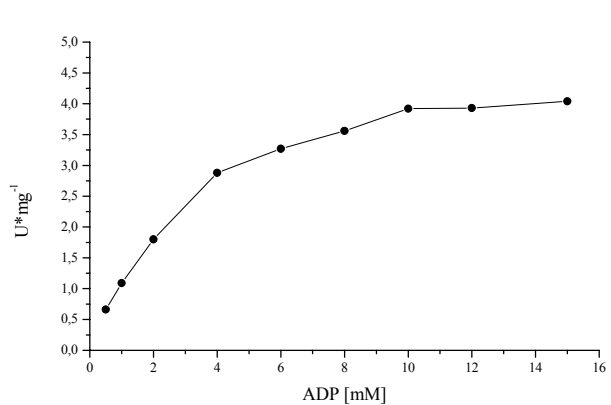
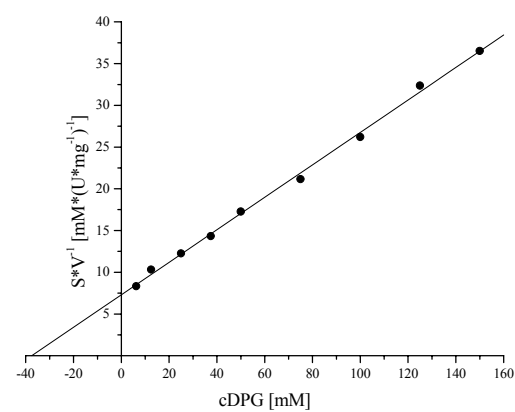
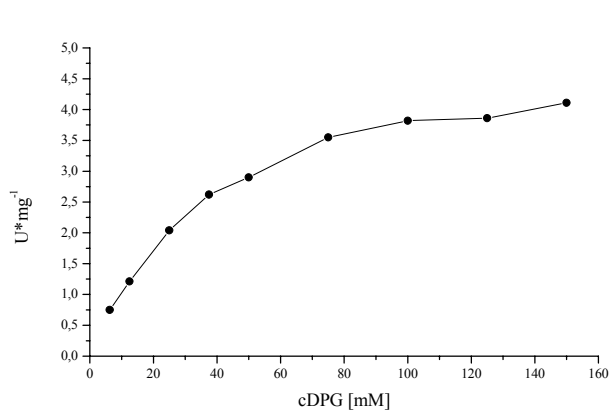
7.1.3 cDPGS aus *Mt. fervidus*-Zellen, mit denen in der logarithmischen Wachstumsphase eine Temperatur-Erniedrigung von 83° C auf 68° C durchgeführt wurde; Ernte nach weiteren 24 h bei 68° C.

a) cDPG-Synthese-Richtung:

Fortsetz.: a) cDPG-Synthese-Richtung (*Mt. fervidus* 83° C → 68° C)

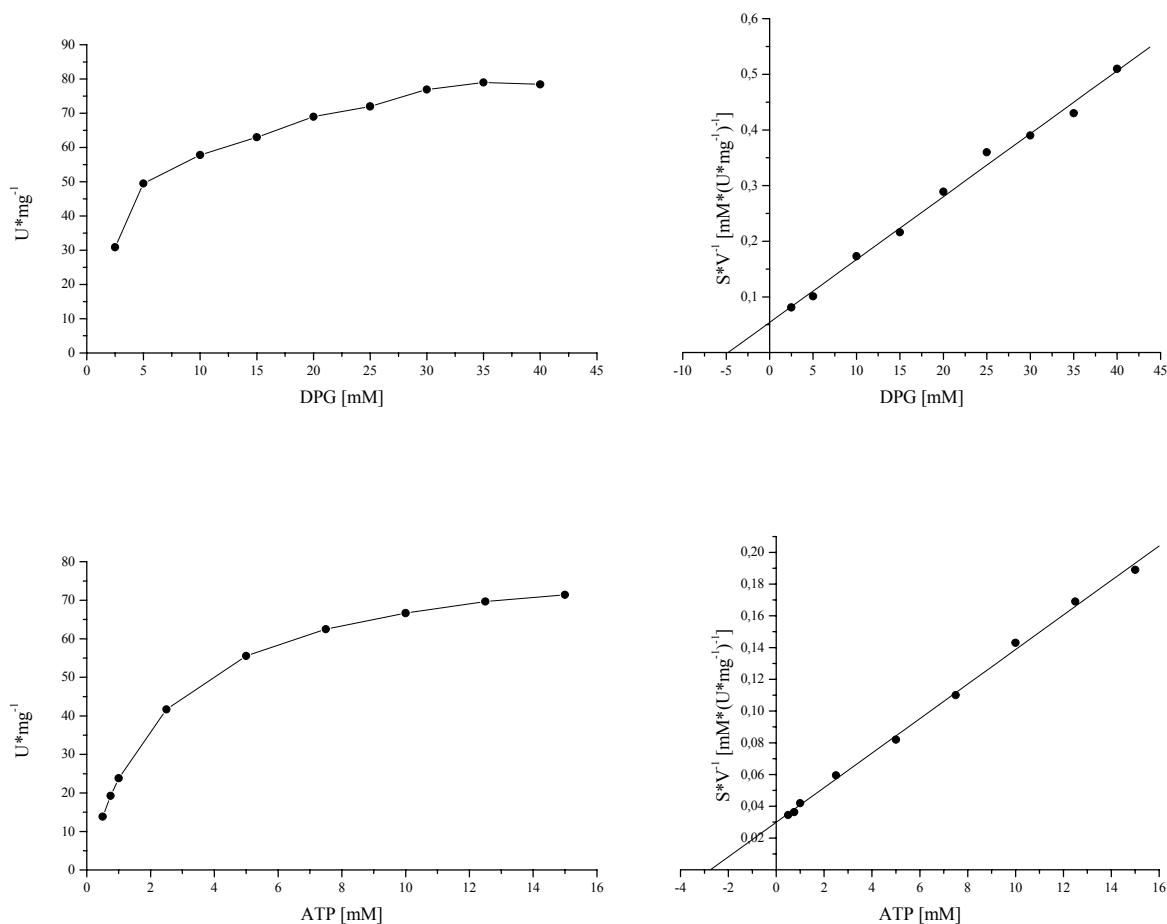


b) cDPG-Hydrolyse-Richtung:

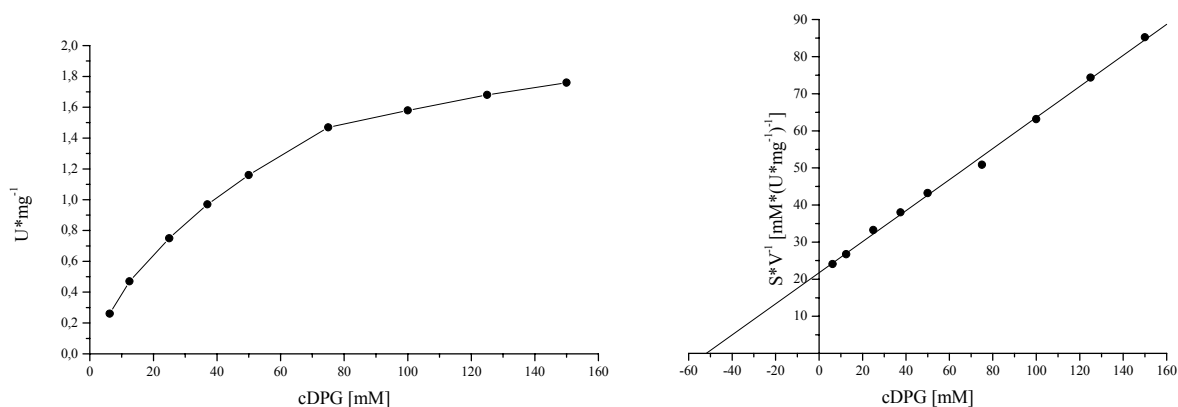


7.1.4 cDPGS aus *Mt. fervidus*-Zellen, mit denen in der logarithmischen Wachstumsphase eine Temperatur-Erhöhung von 83° C auf 93° C durchgeführt wurde; Ernte nach weiteren 24 h bei 93° C.

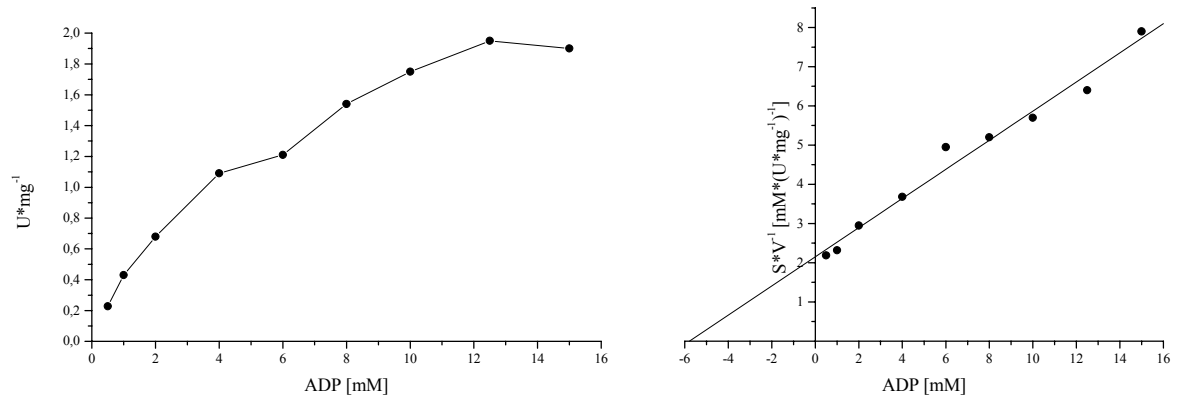
a) cDPG-Synthese-Richtung:



b) cDPG-Hydrolyse-Richtung:



Fortsetz.: b) cDPG-Hydrolyse-Richtung (*Mt. fervidus* 83° C → 93° C)



Erklärungen

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema "Die Bedeutung der cyclischen 2,3-Diphosphoglycerat Synthetase für die temperaturabhängige Regulation der intrazellulären Konzentration von cyclischem 2,3-Diphosphoglycerat im hyperthermophilen Archaeum *Methanothermus fervidus*" zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Patrick Moritz befürworte.

Essen, 20.02.03

Prof. Dr. Reinhard Hensel

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, 20.02.03

Patrick Moritz

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, 20.02.03

Patrick Moritz